

**METHOD FOR NUCLEIC ACID TRANSFECTION OF CELLS****Publication number:** JP2003520253T**Publication date:** 2003-07-02**Inventor:****Applicant:****Classification:**

**- international:** C12N15/09; A61K31/711; A61K47/02; A61K47/18;  
A61K48/00; A61P1/00; A61P3/10; A61P5/48;  
A61P9/00; A61P21/00; A61P25/00; A61P43/00;  
C12N15/87; C12N15/09; A61K31/711; A61K47/02;  
A61K47/16; A61K48/00; A61P1/00; A61P3/00;  
A61P5/00; A61P9/00; A61P21/00; A61P25/00;  
A61P43/00; C12N15/87; (IPC1-7): A61K48/00;  
A61K31/711; A61K47/02; A61K47/18; A61P1/00;  
A61P3/10; A61P5/48; A61P9/00; A61P21/00;  
A61P25/00; A61P43/00; C12N15/09

**- European:** A61K48/00; C12N15/87

**Application number:** JP20010552950T 20010119

**Priority number(s):** US20000487089 20000119; US20010766320 20010118;  
WO2001US01803 20010119

**Also published as:**

WO0152903 (A1)  
US2004092473 (A1)  
EP1250156 (A0)  
CA2397492 (A1)  
AU774301B (B2)

**Report a data error here**

Abstract not available for JP2003520253T

Abstract of corresponding document: **WO0152903**

The present invention describes methods for introducing nucleic acids into a target cell using a transition metal enhancer. A mixture containing nucleic acid and a transition metal enhancer is exposed to cells. The nucleic acid is taken up into the interior of the cell with the aid of the transition metal enhancer. Since nucleic acids can encode a gene, the method can be used to replace a missing or defective gene in the cell. The method can also be used to deliver exogenous nucleic acids operatively coding for proteins that are secreted or released from target cells, thus resulting in a desired biological effect outside the cell. Alternatively, the methods of the present invention can be used to deliver exogenous nucleic acids into a target cell that are capable of regulating the expression of a predetermined endogenous gene. This can be accomplished by encoding the predetermined endogenous gene on the nucleic acid or by encoding the nucleic acid with a sequence that is the Watson-Crick complement of the mRNA corresponding to the endogenous gene.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-520253

(P2003-520253A)

(43) 公表日 平成15年7月2日(2003.7.2)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	特許出願(参考)
A 6 1 K 48/00		A 6 1 K 48/00	4 B 0 2 4
31/711		31/711	4 C 0 7 6
47/02		47/02	4 C 0 8 4
47/18		47/18	4 C 0 8 6
A 6 1 P 1/00		A 6 1 P 1/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 73 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-552950(P2001-552950)  
 (86) (22) 出願日 平成13年1月19日(2001.1.19)  
 (85) 翻訳文提出日 平成14年7月19日(2002.7.19)  
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 0 1 / 0 1 8 0 3  
 (87) 国際公開番号 W O 0 1 / 0 5 2 9 0 3  
 (87) 国際公開日 平成13年7月26日(2001.7.26)  
 (31) 優先権主張番号 0 9 / 4 8 7, 0 8 9  
 (32) 優先日 平成12年1月19日(2000.1.19)  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)  
 (31) 優先権主張番号 0 9 / 7 6 6, 3 2 0  
 (32) 優先日 平成13年1月18日(2001.1.18)  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ジェンテリック, インコーポレーテッド  
 アメリカ合衆国 94501 カリフォルニア  
 州, アラメダ, チャレンジャー ドライブ  
 2061  
 (72) 発明者 ベネット, マイケル, ジェイ.  
 アメリカ合衆国 94803 カリフォルニア  
 州, エル ソブランテ, エル グランデ  
 プレイス 4846  
 (72) 発明者 ロスマン, ステファン, エス.  
 アメリカ合衆国 94708 カリフォルニア  
 州, パークレー, アカシア アベニュー  
 98  
 (74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞に核酸をトランスフェクトする方法

## (57) 【要約】

本発明は、遷移金属エンハンサーを用いて標的細胞に核酸を導入する方法に関する。核酸と遷移金属エンハンサーとを含有する混合物を細胞に暴露する。核酸は、遷移金属エンハンサーの助けをかりて細胞の内部に取り込まれる。核酸は遺伝子をコードすることができるので、この方法を用いて細胞の欠失遺伝子または欠陥遺伝子を置換することができる。また、この方法を用いて、標的細胞から分泌または放出されるタンパク質を機能的にコードする外因性核酸を送達して、該細胞外で所望の生物学的効果を生じさせることもできる。このほか、本発明の方法は、予め決められた内因性遺伝子の発現を調節することのできる外因性核酸を標的細胞に送達すべく使用することもできる。これは、核酸上の予め決められた内因性遺伝子をコード化することにより、または内因性遺伝子に対応するmRNAのワトソン・クリック相補体である配列を有する核酸をコード化することにより達成することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 プロモーターに機能的に連結されたペプチドまたはタンパク質をコードするDNAを哺乳動物に送達する方法であって、イオン化するまたはイオン化された遷移金属エンハンサーと該DNAとを含む組成物に該哺乳動物を暴露することを含み、該DNAが該ペプチドまたは該タンパク質を発現する、上記方法。

【請求項 2】 前記DNAが前記哺乳動物の分泌腺で発現される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 前記分泌腺が、唾液腺、脾臓、乳腺、甲状腺、胸腺、下垂体、および肝臓からなる群より選択される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】 前記分泌腺が唾液腺または脾臓である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】 前記ペプチドまたは前記タンパク質が前記分泌腺から分泌または放出される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】 前記ペプチドまたは前記タンパク質が前記分泌腺から分泌されない、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 7】 前記DNAが、前記哺乳動物の肺、筋肉、脳、血液、乳房、骨、膀胱、皮膚、肝臓、胃、腸、腎臓、精巣、子宮、胃腸管、または卵巣で発現される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】 前記DNAが前記哺乳動物の肺、筋肉、または脳で発現される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】 前記DNAが前記哺乳動物の肺で発現される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】 前記組成物が、筋肉内投与、気管内投与、腹腔内投与、皮内投与、静脈内投与、会陰内投与、皮下投与、舌下投与、鼻腔内吸入投与、鼻腔内滴下投与、直腸内投与、腔内投与、経眼投与、経口投与、腺管内投与、および局所投与からなる群より選択された投与経路により前記哺乳動物に送達される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】 前記組成物が約4.0～約9.0のpHを有する溶液である、請求

項 1 に記載の方法。

【請求項 1 2】 前記組成物が約 5.5 ～ 約 8.5 の pH を有する溶液である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】 前記組成物が約 250 マイクロモルより低い全塩濃度を有する溶液である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】 前記組成物が約 50 マイクロモルより低い累積塩濃度を有する溶液である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】 前記哺乳動物が約 1 マイクログラム ～ 約 100 ミリグラムの前記 DNA に暴露される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】 前記哺乳動物が約 30 マイクログラム ～ 約 30 ミリグラムの前記 DNA に暴露される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】 前記組成物中の前記イオン化しうるまたはイオン化された遷移金属エンハンサーと前記 DNA とのモル比が約 0.0001 : 1 ～ 約 1 : 0.0001 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 8】 前記イオン化しうるまたはイオン化された遷移金属エンハンサーが、d-ブロック元素、第 1 列 f-ブロック元素、アルミニウム、およびガリウムからなる群より選択された元素の錯体、付加物、クラスターまたは塩である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 9】 前記イオン化しうるまたはイオン化された遷移金属エンハンサーが、亜鉛、ニッケル、コバルト、銅、アルミニウム、およびガリウムからなる群より選択された元素の錯体、付加物、クラスターまたは塩である、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】 前記イオン化しうるまたはイオン化された遷移金属エンハンサーが、硫酸亜鉛、酢酸亜鉛、硫酸ニッケル、酢酸ニッケル、硫酸コバルト、酢酸コバルト、硫酸銅、および酢酸銅からなる群より選択される、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】 前記イオン化しうるまたはイオン化された遷移金属エンハンサーが酢酸亜鉛または硫酸亜鉛である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】 前記組成物が溶液であり、前記イオン化しうるまたはイオ

ン化された遷移金属エンハンサーが該溶液中の約0.01ミリモル濃度の $\text{ZnCl}_2$ ～約250ミリモル濃度の $\text{ZnCl}_2$ である、請求項1に記載の方法。

【請求項23】 前記イオン化しうるまたはイオン化された遷移金属エンハンサーが前記溶液中の0.03ミリモル濃度の硫酸亜鉛～約6.0ミリモル濃度の硫酸亜鉛である、請求項22に記載の方法。

【請求項24】 前記組成物が溶液であり、前記イオン化しうるまたはイオン化された遷移金属エンハンサーが該溶液中の約0.01ミリモル濃度の酢酸亜鉛～約250ミリモル濃度の酢酸亜鉛である、請求項1に記載の方法。

【請求項25】 前記組成物が溶液であり、前記イオン化しうるまたはイオン化された遷移金属エンハンサーが該溶液中の約0.03ミリモル濃度の酢酸亜鉛～約6.0ミリモル濃度の酢酸亜鉛である、請求項1に記載の方法。

【請求項26】 前記イオン化しうるまたはイオン化された遷移金属エンハンサーが、ハロゲン化亜鉛、ハロゲン化ニッケル、ハロゲン化コバルト、ハロゲン化銅、ハロゲン化アルミニウム、およびハロゲン化ガリウムからなる群より選択する、請求項1に記載の方法。

【請求項27】 前記イオン化しうるまたはイオン化された遷移金属エンハンサーが、 $\text{ZnCl}_2$ 、 $\text{NiCl}_2$ 、 $\text{CoCl}_2$ 、 $\text{CuCl}_2$ 、 $\text{AlCl}_3$ 、および $\text{GaCl}_3$ からなる群より選択される、請求項26に記載の方法。

【請求項28】 前記組成物が溶液であり、前記イオン化しうるまたはイオン化された遷移金属エンハンサーが該溶液中の約0.01ミリモル濃度の $\text{ZnCl}_2$ ～約250ミリモル濃度の $\text{ZnCl}_2$ である、請求項1に記載の方法。

【請求項29】 前記組成物が溶液であり、前記イオン化しうるまたはイオン化された遷移金属エンハンサーが該溶液中の約0.03ミリモル濃度の $\text{ZnCl}_2$ ～約6.0ミリモル濃度の $\text{ZnCl}_2$ である、請求項1に記載の方法。

【請求項30】 前記組成物が溶液であり、前記イオン化しうるまたはイオン化された遷移金属エンハンサーが該溶液中の約0.01ミリモル濃度の $\text{NiCl}_2$ ～約250ミリモル濃度の $\text{NiCl}_2$ である、請求項1に記載の方法。

【請求項31】 前記イオン化しうるまたはイオン化された遷移金属エンハンサーが前記溶液中の約0.03ミリモル濃度の $\text{NiCl}_2$ ～約6.0ミリモル濃度の $\text{NiCl}_2$

である、請求項30に記載の方法。

【請求項32】 前記組成物が溶液であり、前記イオン化しうるまたはイオン化された遷移金属エンハンサーが該溶液中の約0.01ミリモル濃度の $\text{CoCl}_2$ ～約250ミリモル濃度の $\text{CoCl}_2$ である、請求項1に記載の方法。

【請求項33】 前記イオン化しうるまたはイオン化された遷移金属エンハンサーが前記溶液中の約0.03ミリモル濃度の $\text{CoCl}_2$ ～約6.0ミリモル濃度の $\text{CoCl}_2$ である、請求項32に記載の方法。

【請求項34】 前記組成物が溶液であり、前記イオン化しうるまたはイオン化された遷移金属エンハンサーが該溶液中の約0.01ミリモル濃度の $\text{CuCl}_2$ ～約250ミリモル濃度の $\text{CuCl}_2$ である、請求項1に記載の方法。

【請求項35】 前記イオン化しうるまたはイオン化された遷移金属エンハンサーが前記溶液中の約0.03ミリモル濃度の $\text{CuCl}_2$ ～約6.0ミリモル濃度の $\text{CuCl}_2$ である、請求項34に記載の方法。

【請求項36】 前記組成物が溶液であり、前記イオン化しうるまたはイオン化された遷移金属エンハンサーが該溶液中の約0.01ミリモル濃度の $\text{AlCl}_3$ ～約250ミリモル濃度の $\text{AlCl}_3$ である、請求項1に記載の方法。

【請求項37】 前記イオン化しうるまたはイオン化された遷移金属エンハンサーが前記溶液中の約0.01ミリモル濃度の $\text{AlCl}_3$ ～約250ミリモル濃度の $\text{AlCl}_3$ である、請求項36に記載の方法。

【請求項38】 前記DNAがプラスミドである、請求項1に記載の方法。

【請求項39】 前記タンパク質が、インスリン、ヒト成長ホルモン、エリトロポエチン、凝固因子VII、ウシ成長ホルモン、血小板由来増殖因子、凝固因子VIII、トロンボポエチン、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-1 RA、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、繊維芽細胞増殖因子、神経突起増殖因子、顆粒球コロニー刺激因子、L-アスパラギナーゼ、ウリカーゼ、キモトリプシン、カルボキシペプチダーゼ、スクラーゼ、カルシトニン、Ob遺伝子産物、グルカゴン、トランスフォーミング増殖因子、毛様体神経突起トランスフォーミング因子、インスリン様増殖因子-1、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、インターフェロン $\alpha$ 2A、脳由来神経突起因子、インスリント

ロピン、組織プラスミノゲンアクチベーター、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、アデノシンデアミダーゼ、カルシトニン、アルギナーゼ、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ、 $\gamma$ -インターフェロン、ペプシン、トリプシン、エラスターゼ、ラクターゼ、内因子、コレシストキニン、インスリン向性ホルモン凝固因子I、グルカゴン様タンパク質-I、 $\alpha$ -1-アンチトリプシン、グルコセレブロシダーゼ、嚢胞性繊維症トランスレダクターゼ、アンギオスタチン、エンドスタチン、血管形成剤および抗血管形成剤からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項40】 プロモーターに機能的に連結されたペプチドまたはタンパク質をコードするDNAを哺乳動物の脾臓、肝臓、唾液腺またはマウスの肺に送達する方法であって、該DNAと、塩化亜鉛、塩化銅、塩化ニッケル、塩化コバルト、硫酸亜鉛、および酢酸亜鉛からなる群より選択されたイオン化しうるまたはイオン化された遷移金属エンハンサーとを含む組成物に該哺乳動物を暴露することを含み、該DNAが発現される、上記方法。

【請求項41】 プロモーターに機能的に連結されたペプチドまたはタンパク質をコードするDNAを哺乳動物の細胞に送達する方法であって、イオン化しうるまたはイオン化された遷移金属エンハンサーと該DNAとを含む組成物を該哺乳動物の該細胞に投与することを含んでなる、上記方法。

【請求項42】 前記組成物がカチオン性脂質をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項43】 前記組成物のカチオン性脂質:DNAリン酸比が約0.01~約12である、請求項42に記載の方法。

【請求項44】 前記カチオン性脂質が、1:1 N,N-[ビス(2-ヒドロキシエチル)]-N-メチル-N-[2,3-ビス(テトラデカノイルオキシ)プロピル]アンモニウムクロリドおよびN,N,N',N'-テトラメチル-N,N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2,3-ビス(9(z)-オクタデセノイルオキシ)-1,4-ブタンジアニウムヨージドからなる群より選択される、請求項42に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 1. 発明の簡単な説明

本願は、2000年1月19日出願の同時係属出願第09/487,089号の一部継続出願である。本発明は、細胞に核酸を送達する方法に関する。核酸は、細胞に効果的に核酸を送達するための促進剤として作用する遷移金属エンハンサーと組み合わせて送達される。その結果、核酸によりコードされた外因性タンパク質の発現のような所望の生理学的結果が得られる。いくつかの実施形態では、細胞に核酸を送達するために、核酸を遷移金属エンハンサーとだけでなくカチオン性脂質とも組み合わせる。

## 【0002】

## 2. 発明の背景

組換えDNA技術および遺伝子工学の出現以来、特定の細胞および組織への治療剤やその他の核酸ベースの薬剤のトランスフェクションを促進する方法を開発すべく多大な労力が払われてきた。組換え発現構築物に組み込まれたさまざまな遺伝子を含めて、そのような薬剤を送達するのに、公知の方法が利用される。これらの構築物は、細胞内に到達すると、遺伝子の発現を媒介することができる。そのような開発は、多くの形態の分子医学、特に、欠失または欠陥遺伝子を機能性遺伝子の外因性コピーで置換することのできる遺伝子治療にとって重要なものになってきている。

## 【0003】

典型的には、核酸は、極性の強い大分子である。そのため、核酸は、真核生物および原核生物において細胞膜の不透過性バリアーに直面する。細胞膜は、細胞への核酸の進入を制限または防止する働きをする。種々の遺伝子送達方法の開発は、現在知られている遺伝子治療プロトコルに準拠して行われている。細胞への遺伝子送達の効率を増大させるという点についてはかなりの進歩がみられるが、核酸の取り込みまたはトランスフェクションが制限されるという点が、依然として、効率的な遺伝子治療法を開発するうえで障害となっている。

## 【0004】



細胞に核酸を送達する一般的な方法としては、ex vivoおよびin vivoストラテジーが挙げられる。ex vivo遺伝子治療法では、実験操作に入る前にヒトのような宿主生物から細胞を取り出す。次に、当技術分野で周知の方法を用いてin vitroでこれらの細胞に核酸をトランスフェクトする。その後、遺伝子操作された細胞を宿主生物に再導入する。一方、in vivo遺伝子治療法では、宿主生物から標的細胞を取り出す必要はない。もっと正確に言えば、核酸をリポソームまたはレトロウイルスのような試薬で複合体化してから、公知の方法を用いて生物内の標的細胞に投与することが可能である。たとえば、Morganら、Science 237:1476, 1987; Gerrardら、Nat. Genet. 3:180, 1993を参照されたい。

#### 【0005】

ex vivoまたはin vivo遺伝子治療法のいずれに対しても、細胞をトランスフェクトするためにいくつかの異なる方法を使用することができる。公知のトランスフェクション法は、所定の核酸を標的細胞に送達するために使用される物質に従って分類することが可能である。これらのトランスフェクション用物質によれば、ウイルス依存的、脂質依存的、ペプチド依存的、および直接的トランスフェクション(「ネイキッドDNA」)手法が挙げられる。トランスフェクションに使用される他の方法としては、カルシウム共沈およびエレクトロポレーションが挙げられる。

#### 【0006】

ウイルス法では、遺伝子工学的に作製されたウイルスを宿主細胞に感染させ、これにより、外因性核酸を細胞に「トランスフェクト」する。公知のウイルスベクターの中には、既に具体例が開示されている組換えウイルス、たとえば、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、およびレトロウイルスがある。そのような組換え体は、プロモーターまたはエンハンサーエレメントの制御下に異種遺伝子を担持することができ、ベクターに感染した宿主細胞中でそれらの発現を引き起こすことができる。ワクシニアや他のタイプの組換えウイルスについては、Mackettら、J. Virol. 49:3, 1994によってレビューされている。このほかにKotaniら、Hum. Gene Ther. 5:19, 1994をも参照されたい。

#### 【0007】

しかしながら、ウイルストラנסフェクション法は、細胞ゲノムへの可能なウイルスの組み込みにより、突然変異を誘発するかまたは結果として望ましくないウイルスの増殖を引き起こす危険性をはらんでいる。脊椎動物系での多くの研究により、レトロウイルスDNAを挿入すると細胞遺伝子の不活性化または異所性活性化が起こって疾患を引き起こす可能性があることが確認されている。Leeら, *J. Virol.* 64:5958-5965, 1990を参照されたい。たとえば、レトロウイルスを組み込むことにより生じる周知の結果の1つとして、癌遺伝子の活性化がある。1つの研究は、HIVの挿入によるヒト癌遺伝子の活性化について報告している。Shiramizuら, *Cancer Res.*, 54:2069-2072, 1994。ウイルスベクターはまた、宿主免疫系からの干渉を受けやすい。

#### 【0008】

また、リポソームのような非ウイルスベクターを遺伝子治療で核酸送達用のビヒクルとして使用することも可能である。ウイルスベクターと比べて、リポソームは、より安全で、容量がより大きく、毒性がより少なく、さまざまな核酸ベースの分子を送達することができ、比較的非免疫原性である。Felgner, P.L. および Ringold, G.M., *Nature* 337, 387-388, 1989を参照されたい。これらのベクターのうち、カチオン性リポソームは、*in vitro*で哺乳動物細胞のトラנסフェクションを媒介するのに有効であるため、最もよく研究されている。リポフェクションとして知られる1つの方法では、核酸と、細胞へのトラנסフェクションを促進するカチオン性脂質とから作製されたリポプレックスを使用する。脂質/核酸複合体は、原形質膜またはエンドソーム膜に融合するかまたはそれらを破壊して核酸を細胞に移動させる。リポフェクションは、典型的には、リン酸カルシウムトラנסフェクション法よりも、細胞へのDNAの導入効率は高い。Changら, *Focus* 10:66, 1988。しかしながら、リポフェクション法で一般に使用される脂質複合体のうちのいくつかは、細胞傷害性であるか、または荷電血清成分、血液細胞および細胞外マトリックスとの望ましくない非特異的相互作用を有する。さらに、これらのリポソーム複合体は、過度の非特異的組織内取り込みを促進する可能性がある。

#### 【0009】

公知のタンパク質依存的方法の1つでは、ポリリシンを核酸と混合して使用する。次に、進入させるべくポリリシン/核酸複合体を標的細胞に暴露する。たとえば、Verma および Somia, Nature 389:239, 1997; Wolffら, Science 247:1465, 1990を参照されたい。しかしながら、タンパク質依存的方法は、一般的には効率的でなく、典型的にはカオトロピック濃度のポリリシンを必要とするので、不利である。

#### 【0010】

「ネイキッド」DNAトランスフェクション法には、in vivoで核酸を直接投与する方法が包含される。Germanらに付与された特許第5,837,693号を参照されたい。核酸の投与は、筋肉または皮膚のような器官の組織の間隙への注入、血流または所望の体腔への直接導入、あるいは吸入によって行うことが可能である。これらの「ネイキッド」DNA法では、脂質またはタンパク質のような補助剤をまったく用いずに、核酸を動物に注入するかまたは動物に接触させる。この場合、典型的には、中程度のレベルのトランスフェクションが行われ、所望のタンパク質産物の発現は不十分なものとなる。骨格筋または皮膚のような生体組織に遊離(「ネイキッド」)プラスミドDNAを直接注入すると、タンパク質発現を惹起することはできるが、細胞傷害性Tリンパ球、およびプラスミドに含まれるコードされたタンパク質抗原に対する抗体を誘発する可能性もあることが最近報告された。Ulmerら, Science, 259, 1993, 1745-1749; Wangら, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 90, 4157-4160, 1993; Razら, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 91, 9519-9523, 1994を参照されたい。

#### 【0011】

エレクトロポレーションは、もう1つのトランスフェクション法である。Szoka, Jr. らに付与された米国特許第4,394,448号およびHauserに付与された同第4,619,794号を参照されたい。さまざまな動物および植物の細胞に短時間の高電圧電気パルスを加えると、原形質膜中にナノメートルサイズの細孔が形成される。DNAは、これらの小細孔を介して、または細孔の閉鎖に伴う膜成分の再分布の結果として、細胞質中に直接進入することができる。細胞にDNAを送達するツールとしてのエレクトロポレーションは、in vivo適用の場合には限られた成功しか

収めていない。

【0012】

公知の非ウイルス核酸送達法に共通した欠点は、投与された外因性核酸の量に対して産生された外因性タンパク質の発現量がほとんどの診断法または治療法にとって依然として少なすぎるということである。タンパク質発現のレベルが低いのは、多くの場合、核酸のトランスフェクション率が低いかまたは核酸が不安定性なためである。

【0013】

効率的な核酸送達法を見いだすことに多大な研究努力がはられてきたにもかかわらず、ほとんどの公知の方法は、所望のタンパク質発現を達成するのに十分な細胞トランスフェクションを行うに至っていない。望ましくない影響を最小限に抑えつつ有用な遺伝子をコードする組換え発現構築物を細胞に効率的に導入する核酸送達法を開発することが依然として必要である。

【0014】

3. 発明の概要

本発明は、遷移金属エンハンサーを用いて標的細胞に核酸を導入する方法に関する。本発明の方法によれば、核酸と遷移金属エンハンサーとを含有する混合物を細胞に暴露する。その際、核酸は、遷移金属エンハンサーの助けをかりて細胞の内部に取り込まれる。核酸は遺伝子をコードすることができるので、この方法を用いて細胞の欠失または欠陥遺伝子を置換することができる。この方法はまた、標的細胞から分泌または放出されるポリペプチドを機能的にコードする外因性核酸を送達して該細胞外で所望の生物学的効果を生じさせるべく使用することもできる。このほか、本発明の方法は、予め決められた内因性遺伝子の発現を調節することのできる外因性核酸を標的細胞に送達すべく使用することもできる。これは、核酸上の予め決められた内因性遺伝子をコード化することにより、または内因性遺伝子に対応するmRNAのワトソン・クリック相補体である配列を有する核酸をコード化することにより達成することができる。

【0015】

特に、本発明は、核酸と遷移金属エンハンサーとを含有する溶液に細胞を接触

させることにより標的細胞に核酸を送達する方法に関する。細胞は、生物または初代細胞培養物に由来するものであってもよいし、それらに含まれるものであってもよい。送達される核酸配列は、通常、開示された方法を使用する前に決定される。いくつかの実施形態では、核酸と遷移金属エンハンサーとカチオン性脂質とを含有する溶液に細胞を接触させることにより標的細胞に核酸を送達する。

#### 【0016】

1実施形態では、標的細胞への治療上有効量の核酸の細胞内送達を促進する溶液は、さまざまな細胞タイプで使用するのに好適でありうる。こうした細胞タイプとしては、種々の分泌腺(たとえば、乳腺、甲状腺、膵臓腺、胃腺、および唾液腺)、筋系結合組織、骨、膀胱、皮膚、肝臓、肺、腎臓、種々の生殖器、たとえば、精巣、子宮および卵巣、神経系、すべての他の上皮、内皮、および中胚葉性の組織に関連した細胞タイプが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0017】

他の実施形態では、遷移金属エンハンサーは、d-ブロック元素、ランタニド、アルミニウム、および/またはガリウムの錯体、付加物、クラスターまたは塩である。まだ他の実施形態では、遷移金属エンハンサーは、亜鉛、ニッケル、コバルト、銅、アルミニウムあるいはガリウム複合体である。

#### 【0018】

本発明は、標的細胞に核酸を送達する新規な方法を提供する。本発明の方法によれば、核酸および遷移金属エンハンサーが細胞に暴露される。核酸が有用なタンパク質をコードしている場合、暴露によりタンパク質の測定可能な発現が惹起される可能性がある。そのようなタンパク質発現は、診断および治療のいずれのストラテジーを実施するうえにも有用である。

#### 【0019】

#### 4. 図面の簡単な説明

(図面の簡単な説明については下記参照)

#### 【0020】

#### 5. 詳細な説明

本発明は、遷移金属エンハンサーを用いて細胞に核酸をトランスフェクトする方法を提供する。特に、機能性核酸をコードする組換え発現構築物を遷移金属エンハンサーの存在下で送達する方法を開示する。本発明の目的では、本明細書中で使用する「組換え発現構築物」という用語は、好適な宿主細胞中で遺伝子の発現を行いうる好適な制御配列に機能的に連結された遺伝子またはその断片をコードする核酸を意味する。真核生物遺伝子をコードするcDNAおよびゲノムDNAならびにそれらのキメラなハイブリッドを含む実施形態は、文言上「遺伝子」の定義に包含されるものとみなされる。また、発現時、細胞中で内因性遺伝子の機能を阻害または阻止しうるそのような遺伝子の断片、たとえば、アンチセンス遺伝子の断片も、本発明の組換え発現構築物の範囲内に包含されるものとみなされる。

【0021】

本発明は、遷移金属エンハンサーの存在下で細胞に外因性核酸を送達する方法に関する。核酸に関して使用される「送達」または「送達する」という用語は、核酸が細胞に接触して細胞に進入するように核酸と細胞とを一緒にすることを意味する。本発明の方法による核酸送達は、核酸が遷移金属エンハンサーの存在下で細胞に接触することを意味する。

【0022】

本発明の核酸送達法を用いる細胞への核酸の導入は、任意の方法で行ってよく、好ましくは、導入の結果、細胞中の核酸の量が増大する。さらに、本発明の方法を用いて細胞に送達される核酸は、細胞内で活性形態で存在する。すなわち、転写可能であるか、または他の核酸にハイブリダイズする可能性があるか、あるいは機能性タンパク質産物に翻訳可能である。

【0023】

どのような種類の核酸も細胞に送達することが可能である。こうした核酸としては、天然に存在する核酸(たとえば、ゲノムDNA、mRNA、tRNAなど)、任意の合成核酸、改変された核酸、および1つ以上の保護基を含む核酸が挙げられるが、これらに限定されるものではない。種々のin vivo、ex vivoまたはin vitro法を用いて標的細胞に核酸を送達することが可能である。

【0024】

1実施形態では、本発明に従って使用することのできる核酸として、当技術分野で周知のゲノム核酸またはcDNA核酸が挙げられる。典型的には、所望のタンパク質に対する核酸配列情報は、たとえばGENBANK、EMBL、Swiss-Protのような多数の公的データベースのうちの1つで見いだすことができる。核酸配列情報はまた、雑誌刊行物中にも見いだされる可能性がある。このため、当業者は、公表された配列を有する実質的にすべての公知の遺伝子に対する核酸情報を入手することができる。したがって、本発明に関連させて、当業者は、公的寄託機関または配列を公表した機関もしくは研究者のいずれかから対応する核酸分子を直接取得することができる。

#### 【0025】

他の実施形態では、次に、所望のタンパク質産物をコードするcDNAを用いて、本明細書に記載の核酸発現構築物およびベクターを作製することができる。たとえば、Valletteら、1989, Nucleic Acids Res., 17:723-733;およびYon & Fried, 1989, Nucleic Acids Res., 17:4895を参照されたい。この場合、対象となる治療用核酸配列をコードする公知の核酸は実質的にすべて、本発明の方法で使用するのに適している。

#### 【0026】

本発明の方法による核酸送達は、溶液中の場合のように、核酸と遷移金属エンハンサーと標的細胞とを逐次的にまたは集合的に一緒にすることを開示する。この方法では、核酸および遷移金属エンハンサーを、標的細胞と接触させる前に互いに接触させることが可能である。核酸と遷移金属エンハンサーと標的細胞を混合することまたは一緒にすることは、当業者に公知の任意の方法で行うことができる。

#### 【0027】

本発明の方法では、対象となる外因性核酸を少なくとも1種の遷移金属エンハンサーと混合することにより核酸/遷移金属エンハンサー混合物を形成することができる。次に、核酸/遷移金属エンハンサー混合物を標的細胞に投与する。「投与」は、標的細胞に核酸を暴露する任意の経路として定義しうる。たとえば、筋肉内に、気管内に、腹腔内に、皮内に、静脈内に、会陰内に、皮下に、腺管内

に、舌下に、鼻腔内吸入で、鼻腔内滴下で、直腸内に、腔内に、経眼的に、経口的に、外分泌腺の腺管内に、および／または局所遺伝子送達で、溶液を投与することが可能である。核酸/遷移金属エンハンサー混合物を取り込むことのできる標的細胞の例は、外分泌腺である。「外分泌腺」は、管または道を利用して器官の外部または表面に分泌物を放出する腺として定義することができる。外分泌腺の例は、唾液腺および膵臓である。このほか、対象の生物から標的細胞を採取し、これを用いて当技術分野で公知の方法により初代培養物を作製することも可能である。次に、初代培養物を核酸/遷移金属エンハンサー混合物と接触させて、初代培養物の細胞による核酸の物理的取り込みを引き起こすことが可能である。その後、細胞を標的生物に再導入することが可能である。

【0028】

公知のin vivoおよび／またはex vivo遺伝子治療法に従って本発明を使用してもよい。たとえば、核酸/遷移金属エンハンサー混合物をex vivo遺伝子治療法で使用する場合、対象の生物から標的細胞を採取し、次に、核酸/遷移金属エンハンサー混合物に直接暴露する。このほか、核酸/遷移金属エンハンサー溶液をさまざまな所望のin vivo法に適用する場合、投与後、核酸/遷移金属エンハンサー混合物が標的細胞に直接暴露されるようにしてもよい。たとえば、標的細胞を含む組織の間隙に核酸/遷移金属エンハンサー溶液を注入することにより、標的細胞を遺伝子に暴露してもよい。より特定的には、対象の標的細胞が筋肉または皮膚の細胞である場合、核酸/遷移金属エンハンサー混合物を筋肉または皮膚の間隙に注入してもよい。遺伝子治療における公知の適用例に加えて、本発明の方法は、細胞への核酸の物理的取り込みを必要とするあらゆる適用例において一般的方法として新規に使用することが可能である。

【0029】

in vivoおよびex vivo遺伝子治療法に適用されるような本発明の方法の適用は、本発明に係る方法の1実施形態を具体的に説明するのに役立つにすぎない。実際、in vivoおよびex vivo遺伝子治療法で一般に使用される以外の従来法によって、標的細胞を核酸/遷移金属エンハンサー溶液に暴露することが可能である。

【0030】



標的細胞に核酸/遷移金属エンハンサーを暴露するために使用されるin vivo法、ex vivo法または他の方法のいずれであるかにかかわらず、標的細胞を溶液に十分に暴露すれば、標的細胞への核酸の物理的取り込みを行うことは可能であろう。好ましい実施形態では、対象となる外因性核酸は、ポリペプチドをコードし、標的細胞中でトランスフェクションを引き起こすことのできる所望のプロモーターに機能的に連結される。本明細書に定義されているように、安定なトランスフェクションは、対象となる外因性核酸が標的細胞のゲノムにうまく組み込まれた場合に生じる。一過性トランスフェクションは、本明細書では、標的細胞のゲノムへの外因性核酸の取り込みに依存しないタイプのトランスフェクションとして定義される。

#### 【0031】

対象となる外因性核酸の一部分が転写される1実施形態では、転写されたmRNAは対象のタンパク質に翻訳される。翻訳されたタンパク質は、標的細胞内で所望の生物学的効果を有していてもよいし、あるいは標的細胞が、翻訳されたタンパク質を分泌もしくは放出して、タンパク質は、細胞外で所望の生物学的効果を奏してもよい。

#### 【0032】

### 5.1 核酸送達に有用な遷移金属エンハンサー

#### 5.1.1 有用な遷移金属エンハンサーの概要

本発明の遷移金属エンハンサーとしては、遷移金属、遷移金属錯体、遷移金属付加物、遷移金属クラスター、遷移金属塩、およびその混合物が挙げられる。遷移金属エンハンサーとしては、種々の方法で多様なその他の元素と化学的に結合して存在するいずれの遷移金属も包含される。特に、本発明の遷移金属エンハンサーの遷移金属原子は、1以上の酸化状態、すなわち遊離イオンとしてまたは結合形で存在すると考えられる。本発明の遷移金属エンハンサーの遷移金属原子はそれ自身が、錯体のリガンドに直接結合する、付加物のその他の化学種と弱く結合する、またはイオンとして反対の電荷をもつ別のイオン、「カウンターイオン」と直接接触している、あるいは塩として存在すると考えられる。錯体は総合的に電荷を有するため、中性を維持するためにカウンターイオンと結合していると思

われる。

### 【0033】

本発明の遷移金属エンハンサーとしては、周期表の第IIIB、IVB、VB、VIIB、VIIIB、IBおよびIIB族の元素から選択される1以上の遷移金属原子を有する化合物が包含される。この元素群は本明細書ではd-ブロックと定義する。例えば、Huhey, INORGANIC CHEMISTRY, Harper & Row, New York, 1983を参照のこと。本発明の遷移金属エンハンサーとしては、遷移金属錯体と類似した化学特性を有するランタニドおよび主族元素もまた包含される。本明細書で定義するように、ランタニドは周期表のf-ブロックの第1列にあり、主族元素は周期表の第IIIA、IVA、VA、およびVIIA族のものである。この最初の5族はp-ブロックとして当業者には公知である。

### 【0034】

本発明の遷移金属エンハンサーは、化学的に起こりうる、限定されるものではないが、配位数1、2、3、4、5、6、7、8以上などのいずれもの配位数を有するあらゆる錯体形態で見出される。さらに遷移金属原子またはイオンに配位されるリガンドは、限定されるものではないが、四面体型、八面体型、平面4配位、三角形両錐体型、四角ベース十錐体型、五角形両錐体型および立方体をはじめとする、いずれもの幾何学配置をとると考えられる。さらに、いずれもの所与の形状で、本発明の遷移金属エンハンサーは、限定されるものではないが、シスおよびトランス異性などのいずれもの可能な原子空間的配置をとり、異なる異性体が目視可能な時間よりも速く相互交換する変化反応を受けられると思われる。さらに、本発明の遷移金属エンハンサーは、限定されるものではないが、酸化状態0、1、2、3または4および形式的に負であるものなどのいずれもの化学的に起こりうる酸化状態にあると思われる。さらに、本発明としては、いずれもの遷移金属のあらゆる同位元素が包含される。本発明の遷移金属エンハンサーとしては、遷移金属原子またはいずれものリガンドを含有しないイオンもまた包含される。

### 【0035】

#### 5.1.2 遷移金属

本発明の方法に従って遷移金属エンハンサーを形成するために、以下のいずれ

かの金属と、いずれかの無機もしくは有機リガンド、またはかかるリガンドの混合物とを結合してもよい。

#### 【0036】

##### 5.1.2.1 d-ブロック元素

本発明の遷移金属エンハンサーとしては、スカンジウム、チタン、バナジウム、クロム、マンガン、鉄、コバルト、ニッケル、銅、亜鉛、イットリウム、ジルコニウム、ニオブ、モリブデン、テクネチウム、ルテニウム、ロジウム、パラジウム、銀、カドミウム、ランタン、ハフニウム、タンタル、タングステン、レニウム、オスミウム、イリジウム、白金、金、水銀またはアクチニウムを含有する化合物が挙げられる。本発明の遷移金属エンハンサーとしては、ラザフォードイウム、ハーニウムをはじめとする、一般に「トランス-アクチニド」元素に類別されるd-ブロックに属するメンバーおよび原子番号106~112の元素から誘導された化合物もまた包含される。

#### 【0037】

##### 5.1.2.2 ランタニド

本発明の遷移金属エンハンサーとしては、ランタニド金属、錯体、付加物、クラスター、塩、またはそのエンハンサーもまた包含される。本明細書で定義されるランタニドとしては、セリウム、サマリウムおよびガドリニウムが挙げられる。

#### 【0038】

##### 5.1.2.3 p-ブロック元素

本発明の遷移金属エンハンサーとしては、銅のような遷移金属様の特性を有するp-ブロック元素を含有する錯体、付加物、クラスター、塩、およびその混合物が挙げられる。よって、本発明の遷移金属エンハンサーとしては、アルミニウム、ガリウム、インジウム、錫、アンチモン、タリウムおよび鉛を含有する錯体、付加物、クラスターおよび／または塩が挙げられる。

#### 【0039】

##### 5.1.3 遷移金属リガンド

本発明に従って用いる遷移金属エンハンサーを形成するため、遷移金属および

ランタニド系列およびp-ブロック元素に属する同様のメンバーとのキレート化または付加物の形成に用いるリガンドは、無機試薬ならびに有機化学で一般的に認められる化合物種から組み合わせて使用することができる。

#### 【0040】

##### 5.1.3.1 無機リガンド

本発明の遷移金属エンハンサーを形成するために遷移金属を含む元素のキレート化に用いる無機試薬としては、限定されるものではないが、アンモニア、シアン化アニオン、ハロゲン化物(臭化物、塩化物、フッ化物およびヨウ化物など)、水酸化物、二窒素、一酸化炭素、二酸素、酸塩化物、水素、水、およびその混合物が挙げられる。

#### 【0041】

##### 5.1.3.2 有機リガンド

本発明の遷移金属エンハンサーを形成する遷移金属のキレート化に用いる化合物としては、限定されるものではないが、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、アリール、アルカリル、ヘテロアリールおよびアルキルヘテロアリール(alkheteroaryl)が挙げられる。

#### 【0042】

本明細書で定義されるアルキルは、飽和分枝鎖、直鎖または環式炭化水素ラジカルである。典型アルキル基としては、限定されるものではないが、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、シクロプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、シクロブチル、ペンチル、イソペンチル、シクロペンチル、ヘキシル、シクロヘキシルなどが挙げられる。好ましい実施形態では、本発明のアルキル基は(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>)アルキル、さらに好ましくは(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)アルキル、最も好ましくは(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)アルキルである。

#### 【0043】

本明細書で定義される置換アルキルは、1以上の水素原子が各々独立して別の置換基と置き換えられたアルキルラジカルである。典型置換基としては、限定されるものではないが、-R、-OR、-SR、-NRR、-CN、-NO<sub>2</sub>、-C(O)R、-C(O)OR、-C(O)

)NRR、 $-C(NRR)=NR$ 、 $-C(O)NROR$ 、 $-C(NRR)=NOR$ 、 $-NR-C(O)R$ 、-テトラゾール-5-イル、 $-NR-SO_2-R$ 、 $-NR-C(O)-NRR$ 、 $-NR-C(O)-OR$ 、-ハロゲンおよび-トリハロメチル(ただし、各Rは独立して本明細書で定義される-H、 $(C_1-C_{20})$ アルキル、 $(C_2-C_{20})$ アルケニル、 $(C_2-C_{20})$ アルキニル、 $(C_5-C_{20})$ アリールおよび $(C_6-C_{26})$ アルカリルである)が挙げられる。

#### 【0044】

本明細書で定義されるアルケニルは、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を有する不飽和分枝鎖、直鎖または環式炭化水素ラジカルである。ラジカルは二重結合に関してシスまたはトランス配座をとってよい。典型アルケニル基としては、限定されるものではないが、エテニル、ビニリデン、プロペニル、プロピリデン、イソプロペニル、イソプロピリデン、ブテニル、ブテニリデン、イソブテニル、*t*-ブテニル、シクロブテニル、ペンテニル、イソペンテニル、シクロペンテニル、ヘキセニル、シクロヘキセニル等が挙げられる。好ましい実施形態では、本発明のアルケニル基は、 $(C_2-C_{20})$ アルケニル、さらに好ましくは $(C_2-C_{10})$ アルケニル、最も好ましくは $(C_2-C_5)$ アルケニルである。

#### 【0045】

本明細書で定義される置換アルケニルは、1以上の水素原子が各々独立して別の置換基と置き換えられたアルケニルラジカルである。典型置換基としては、限定されるものではないが、 $-R$ 、 $-OR$ 、 $-SR$ 、 $-NRR$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-C(O)NRR$ 、 $-C(NRR)=NR$ 、 $-C(O)NROR$ 、 $-C(NRR)=NOR$ 、 $-NR-C(O)R$ 、-テトラゾール-5-イル、 $-NR-SO_2-R$ 、 $-NR-C(O)-NRR$ 、 $-NR-C(O)-OR$ 、-ハロゲンおよび-トリハロメチル(ただし、各Rは独立して本明細書で定義される-H、 $(C_1-C_8)$ アルキル、 $(C_2-C_8)$ アルケニル、 $(C_2-C_8)$ アルキニル、 $(C_5-C_{20})$ アリールおよび $(C_6-C_{26})$ アルカリルである)が挙げられる。

#### 【0046】

本明細書で定義されるシクロアルキルは、環式または多環式飽和または不飽和炭化水素ラジカルである。典型シクロアルキル基としては、限定されるものではないが、シクロプロパニル、シクロブタニル、シクロペンタニル、シクロヘキサニルおよび高級シクロアルキル、アダマンチル、クバニル、プリスマニルおよび

高級多環式アルキルなどが挙げられる。好ましい実施形態では、本発明のシクロアルキルは、(C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub>)シクロアルキルである。

#### 【0047】

本明細書で定義される置換シクロアルキルは、1以上の水素原子が各々独立して別の置換基と置き換えられたシクロアルキルラジカルである。典型置換基としては、限定されるものではないが、-R、-OR、-SR、-NRR、-CN、-NO<sub>2</sub>、-C(O)R、-C(O)OR、-C(O)NRR、-C(NRR)=NR、-C(O)NROR、-C(NRR)=NOR、-NR-C(O)R、-テトラゾール-5-イル、-NR-SO<sub>2</sub>-R、-NR-C(O)-NRR、-NR-C(O)-OR、-ハロゲンおよびトリハロメチル(ただし、各Rは独立して本明細書で定義されるH、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)アルキル、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルケニル、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)アルキニル、(C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>)アリールおよび(C<sub>6</sub>-C<sub>26</sub>)アルカリルである)が挙げられる。

#### 【0048】

本明細書で定義されるヘテロシクロアルキルは、環炭素原子の1つがN、P、O、S、As、Ge、Se、Si、Teなどのような別の原子と置き換えられたシクロアルキル部分である。典型ヘテロシクロアルキルとしては、限定されるものではないが、イミダゾリジル、ピペラジル、ピペリジル、ピラゾリジル、ピロリジル、キヌクリジル他が挙げられる。好ましい実施形態では、シクロヘテロアルキルは、5~10員環である。特に好ましくはシクロヘテロアルキルは、モルホリノ、テトラヒドロフリルおよびピロリジルである。

#### 【0049】

本明細書で定義される置換ヘテロシクロアルキルは、1以上の水素原子が各々独立して別の置換基と置き換えられたシクロヘテロアルキルラジカルである。典型置換基としては、限定されるものではないが、-R、-OR、-SR、-NRR、-CN、-NO<sub>2</sub>、-C(O)R、-C(O)OR、-C(O)NRR、-C(NRR)=NR、-C(O)NROR、-C(NRR)=NOR、-NR-C(O)R、-テトラゾール-5-イル、-NR-SO<sub>2</sub>-R、-NR-C(O)-NRR、-NR-C(O)-OR、-ハロゲンおよびトリハロメチル(ただし、各Rは独立して本明細書で定義されるH、(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>)アルキル、(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>)アルケニル、(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>)アルキニル、(C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>)アリール、(C<sub>6</sub>-C<sub>26</sub>)アルカリル、5~20員ヘテロアリールおよび6~26員アルキル-ヘテロアリール(alk-heteroaryl)である)が挙げられる。

## 【0050】

本明細書で定義されるアリールは、共役 $\pi$ 電子系を有する不飽和環式炭化水素ラジカルである。典型アリール基としては、限定されるものではないが、ペンタ-2,4-ジエニル、フェニル、ナフチル、アセアントリリル、アセナフチル、アントラシル、アズレニル、クリセニル、インダセニル、インダニル、オバレニル、ペリレニル、フェナントレニル、フェナレニル、ピセニル、ピレニル、ピラントレニル、ルビセニルなどが挙げられる。好ましい実施形態では、アリール基は、(C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>)アリール、さらに好ましくは(C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub>)アリール、最も好ましくはフェニルである。

## 【0051】

本明細書で定義されるアルカリルは、末端炭素に結合した水素原子の1つが(C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>)アリール部分と置き換えられた直鎖(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>)アルキル、(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>)アルケニルまたは(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>)アルキニル基である。またアルカリルとは、末端炭素に結合した水素原子の1つがアリール部分と置き換えられた分枝鎖アルキル、アルケニルまたはアルキニル基も指す。典型アルカリル基としては、限定されるものではないが、ベンジル、ベンジリデン、ベンジリジン、ベンゼノベンジル、ナフタレノベンジルなどが挙げられる。好ましい実施形態では、アルカリル基は、(C<sub>6</sub>-C<sub>26</sub>)アルカリルである、すなわち、アルカリル基のアルキル、アルケニルまたはアルキニル部分が(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>)であり、かつアリール部分が(C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>)である。特に好ましい実施形態では、アルカリル基は、(C<sub>6</sub>-C<sub>13</sub>)である、すなわち、アルカリル基のアルキル、アルケニルまたはアルキニル部分が(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)であり、かつアリール部分が(C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub>)である。

## 【0052】

本明細書で定義されるヘテロアリールは、1個以上の炭素原子がN、P、O、S、As、Ge、Se、Si、Teなどのような別の原子と置き換えられたアリール部分である。典型ヘテロアリール基としては、限定されるものではないが、アクリドアルシン、アクリジン、アルサントリジン、アルシンドール、アルシンドリン、ベンゾジオキソール、ベンゾチアジアゾール、カルバゾール、 $\beta$ -カルボリン、クロマン、クロメン、シンノリン、フラン、イミダゾール、インダゾール、インドール

、イソインドール、インドリジン、イソアルシンドール、イソアルシノリン、イソベンゾフラン、イソクロマン、イソクロメン、イソインドール、イソホスホインドール、イソホスフィノリン、イソキノリン、イソチアゾール、イソキサゾール、ナフチリジン、ペリミジン、フェナントリジン、フェナントロリン、フェナジン、ホスホインドール、ホスフィノリン、フタラジン、ピアゾチオール、プテリジン、プリン、ピラン、ピラジン、ピラゾール、ピリダジン、ピリジン、ピリミジン、ピロール、ピロリジン、キナゾリン、キノリン、キノリジン、キノキサリン、セレノフェン、テルロフェン、チアゾピロリジン、チオフェンおよびキサテンが挙げられる。

#### 【0053】

本明細書で定義されるアルキル-ヘテロアリール(alk-heteroaryl)は、末端炭素原子に結合した水素原子の1つがヘテロアリール部分と置き換えられた直鎖アルキル、アルケニルまたはアルキニル基である。好ましい実施形態では、アルキル-ヘテロアリール基は、6~26員のアルキル-ヘテロアリールである、すなわち、アルキル-ヘテロアリールのアルキル、アルケニルまたはアルキニル部分が(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)であり、かつヘテロアリール部分が5~20員のヘテロアリールである。特に好ましい実施形態では、アルキル-ヘテロアリールは、6~13員である、すなわち、アルキル、アルケニルまたはアルキニル部分が(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)であり、かつヘテロアリール部分が5~10員のヘテロアリールである。

#### 【0054】

本発明の好ましい有機リガンドは、アセチレンおよびその誘導体、アセテート、アセチルアセトネート、ベンゾエート、エチレンビス(ジチオカルバメート)、ブタジエン、ブチレート、カルボキシレート(ホルメート、ブタノエート、プロピオネート、ペンタノエート、ヘキサノエート、オクタノエート、ドデカノエートおよびデカノエートなど)、シトレート、シアノアルキル、ハロゲン化アルキル、ジメチルグリオキシム、グルコネート、グリシネート、ラクテート、アルキル基(メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、*t*-ブチルなど)、アルコキシド(メトキシド、エトキシドなど)、オレエート、オキサレート、パルミテート、フェノキシド、フェノールスルホネート、*p*-フェノールスルホネート、*p*-



ロピレンビス(ジチオカルバメート)、サリチレート、ステアレート、タルトレート、アルキルアミン、アルケン(エチレン、プロペン、ブテンなど)、ベンゼンおよび置換ベンゼン、シクロブタジエン、シクロペンタジエン、ピリジン、シクロヘプタトリエン、シクロオクタテトラエンならびにアリル基である。

### 【0055】

#### 5.1.3.3 付加物

本発明の方法に従って遷移金属エンハンサーを形成するために、遷移金属およびそれらの錯体に対する、またはそれらとともに付加物を形成するカウンターイオンとして作用し得る特定の基がある。かかる部分としては、限定されるものではないが、アセト亜ヒ酸塩、アンチモン化物、ヒ酸塩、ヒ化物、亜ヒ酸塩、ホウ酸塩、炭酸塩、クロム酸塩、亜クロム酸塩、シアン化物、シアン酸塩、イソシアン酸塩、過酸化物、ヘキサフルオロ硫酸塩、ヒドロ亜リン酸塩、次亜リン酸塩、ヒドロ亜硫酸塩、フルオロホウ酸塩、フェロシアン化物、メタ-亜ヒ酸塩、メタホウ酸塩、メタリン酸塩、硝酸塩、硝酸塩六水和物、窒化物、亜硝酸塩、オルト-ヒ酸塩、過塩素酸塩、過塩素酸塩六水和物、過マンガン塩、リン酸塩、リン化物、亜リン酸塩、ピロリン酸塩、セレン酸塩、セレン化物、ケイ酸塩、スズ酸塩、硫酸塩、硫化物、亜硫酸塩、チオシアン酸塩、チタン酸塩、タングステン酸塩および1種以上の上記のものを含有する複合塩が挙げられる。

### 【0056】

#### 5.1.4 遷移金属エンハンサー例

本発明の方法に従って用い得る遷移金属エンハンサーとしては、限定されるものではないが、硝酸コバルト(II)、酸化コバルト(II)、酸化コバルト(III)、亜硝酸コバルト、リン酸コバルト(III)、塩化コバルト(II)、塩化コバルト(III)、炭酸コバルト(II)、酢酸クロム(II)、酢酸クロム(III)、臭化クロム(III)、塩化クロム(II)、フッ化クロム(III)、酸化クロム(II)、二酸化クロム、酸化クロム(III)、亜硫酸クロム(III)、硫酸クロム(II)七水和物、硫酸クロム(III)、ギ酸クロム(III)、ヘキサ酸クロム(III)、酸塩化クロム、亜リン酸クロム(III)、酸化銅(I)、酸化銅(II)、塩化銅(II)、酢酸銅(I)、酸化銅(I)、塩化銅(I)、酢酸銅(II)、臭化銅(II)、塩化銅(II)、ヨウ化銅(II)、酸化銅(II)、硫酸銅(II)および

硫化銅(II)、プロピオン酸銅(II)、酢酸銅(II)、メタホウ酸銅(II)、安息香酸銅(II)、ギ酸銅(II)、ドデカン酸銅(II)、亜硝酸銅(II)、酸塩化銅(II)、パルミチン酸銅(II)、サリチル酸銅(II)、ヨウ化マンガン、硫酸マンガン、酢酸マンガン(II)、安息香酸マンガン(II)、炭酸マンガン(II)、塩化マンガン、臭化マンガン、二塩化マンガン、三塩化マンガン、クエン酸マンガン(II)、ギ酸マンガン(II)、硝酸マンガン(II)、シュウ酸マンガン(II)、一酸化マンガン、二酸化マンガン、三酸化マンガン、七酸化マンガン、リン酸マンガン(III)、ピロリン酸マンガン(II)、メタリン酸マンガン(III)、次亜リン酸マンガン(II)、吉草酸マンガン(II)、酢酸鉄(II)、安息香酸鉄(III)、臭化鉄(II)、炭酸鉄(II)、ギ酸鉄(III)、乳酸鉄(II)、硝酸鉄(II)、酸化鉄(II)、酸化鉄(III)、酢酸鉄(III)、次亜リン酸鉄(III)、硫酸鉄(III)、亜硫酸鉄(II)、ヒドロ亜硫酸鉄(III)、臭化鉄(II)、臭化鉄(III)、塩化鉄(II)、塩化鉄(III)、ヨウ化鉄(II)、ヨウ化鉄(III)、アセチルアセトン酸ニッケル、臭化ニッケル、炭酸ニッケル、塩化ニッケル、シアン化ニッケル、二臭化ニッケル、二塩化ニッケル、ジオレイン酸ニッケル、フッ化ニッケル、フルオロホウ酸ニッケル、水酸化ニッケル、メチル酸ニッケル、硝酸ニッケル、硝酸ニッケル六水和物、酸化ニッケル、ステアリン酸ニッケル、硫酸ニッケル、亜硫酸ニッケル、タリウム酸ニッケルまたはリシノール酸のようなその他の有機酸のニッケル塩、塩化コバルト、フッ化コバルト、硝酸コバルト、硫酸コバルト、オクタン酸コバルト、フルオロホウ酸コバルト、ステアリン酸コバルト、酸化コバルト、水酸化コバルト、臭化コバルト(II)、塩化コバルト(II)、酪酸コバルト、硝酸コバルト(II)六水和物、塩化亜鉛、酢酸亜鉛、臭化亜鉛、炭酸亜鉛、クエン酸亜鉛、フッ化亜鉛、水酸化亜鉛、ヨウ化亜鉛、硝酸亜鉛、酸化亜鉛、硫酸亜鉛またはその混合物が挙げられる。数多くのその他の遷移金属エンハンサーも本発明の範囲内である。本節では本発明の方法に好適な、有望な遷移金属エンハンサーのいくつかを例示したに過ぎない。

#### 【0057】

好ましい実施形態では、本発明の遷移金属エンハンサーは、遊離金属、錯体、付加物、クラスターおよび／または亜鉛、銅、ニッケル、コバルト、アルミニウムもしくはガリウムの塩である。

## 【0058】

特に好ましい遷移金属エンハンサーとしては、亜鉛および銅含有化合物が挙げられる。さらに好ましくは、遷移金属エンハンサーは、亜鉛、ニッケル、コバルト、銅、アルミニウムまたはガリウムのハロゲン化物である。なおいっそうさらに好ましい実施形態では、遷移金属エンハンサーは、 $\text{ZnCl}_2$ 、 $\text{NiCl}_2$ 、 $\text{CoCl}_2$ 、 $\text{CuCl}_2$ 、 $\text{AlCl}_3$ または $\text{GaCl}_3$ である。いっそうさらに好ましくは、遷移金属エンハンサーは、酢酸亜鉛、塩化亜鉛または硫酸亜鉛である。

## 【0059】

その他の実施形態では、遷移金属エンハンサーは、そのカウンターイオンとの亜鉛アンモニウム錯体、アンチモン化亜鉛、ヒ酸亜鉛、ヒ化亜鉛、亜ヒ酸亜鉛、安息香酸亜鉛、ホウ酸亜鉛 ( $\text{Zn}_2\text{B}_6\text{O}_{11}$ )、過ホウ酸亜鉛、臭化亜鉛、酪酸亜鉛、炭酸亜鉛、クロム酸亜鉛、亜鉛クロム、亜クロム酸亜鉛、クエン酸亜鉛、デカン酸亜鉛、ニクロム酸亜鉛、亜鉛二量体、エチレンビス(ジチオカルバミン酸)亜鉛、フッ化亜鉛、ギ酸亜鉛、グルコン酸亜鉛、グリセリン酸亜鉛、グリコール酸亜鉛、水酸化亜鉛、ヨウ化亜鉛、乳酸亜鉛、亜鉛メトキシエトキシド、ナフテン酸亜鉛、硝酸亜鉛、硝酸亜鉛六水和物、硝酸亜鉛三水和物、オクタン酸亜鉛、オレイン酸亜鉛、酸化亜鉛、ペンタン酸亜鉛、過塩素酸亜鉛六水和物、過酸化亜鉛、フェノールスルホン酸亜鉛、プロピオン酸亜鉛、プロピレンビス(ジチオカルバミン酸)亜鉛、スズ酸亜鉛、ステアリン酸亜鉛、硫酸亜鉛、チタン酸亜鉛、テトラフルオロホウ酸亜鉛、トリフルオロメタンスルホン酸亜鉛、およびそのエンハンサーである。

## 【0060】

核酸および遷移金属エンハンサーの送達は、以下に記載する生物工学分野で公知の技術を用いて行う。

## 【0061】

5.2 核酸送達に有用なバッファー

核酸／遷移金属エンハンサー混合物の最適pH範囲は、核酸組成、遷移金属エンハンサーの種類および混合物を与える特定の細胞型に応じて変化し得る。

## 【0062】

ある実施形態では、核酸／遷移金属エンハンサー溶液の緩衝剤処理を行わない。しかしながら、その他の実施形態では、溶液の緩衝剤処理を行ってよい。1種類以上のバッファーを用いて、例えば、長期間の核酸／遷移金属エンハンサー混合物の保存用に安定した状態を提供することができる。核酸を分解状態に付すことのないいずれものバッファーまたはpHを本発明の方法に用いることができる。非天然の核酸を用いる場合、所望のバッファーは通常の遺伝子治療に用いるものとは実質的に異なったものであると考えられる。本発明の核酸／遷移金属エンハンサー混合物の緩衝剤として用いることのできる典型バッファーとしては、限定されるものではないが、N-[カルバモイルメチル]-2-アミノエタンスルホン酸(ACES)、N-2[2-アセトアミド]-2-イミノニ酢酸(ADA)、2-アミノ-2-メチル-2,3-プロパンジオール、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール、3-アミノ-1-プロパンスルホン酸、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール、3-[(1,1-ジメチル-2-ヒドロキシエチル)アミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(AMSO)、N,N-ビス[2-ヒドロキシエチル]-2-アミノエタンスルホン酸(BES)、N,N-ビス[2-ヒドロキシエチル]グリシン(BICINE)、ビス[2-ヒドロキシエチル]イミノトリス-[ヒドロキシメチル]メタン(BIS-TRIS)、1,3-ビス[トリス(ヒドロキシメチル)-メチルアミノ]プロパン(BIS-TRIS PROPANE)、4-[シクロヘキシルアミノ]-1-ブタンスルホン酸(CABS)、3-[シクロヘキシルアミノ]-1-プロパンスルホン酸(CAPS)、3-[シクロヘキシルアミノ]-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホン酸(CAPSO)、2-[N-シクロヘキシルアミノ]エタンスルホン酸(CHES)、3-[N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(DIPSO)、N-[2-ヒドロキシ-エチル]-ピペラジン-N'-[3-プロパンスルホン酸](HEPPS)、N-[2-ヒドロキシエチル]ピペラジン-N'-[4-ブタンスルホン酸](HEPBS)、N-[2-ヒドロキシエチル]ピペラジン-N'-[2-エタンスルホン酸](HEPES)、N-[2-ヒドロキシエチル]ピペラジン-N'-[2-ヒドロキシプロパンスルホン酸](HEPPSO)、イミダゾール、2-[N-モルホリノ]エタンスルホン酸(MES)、4-[N-モルホリノ]ブタンスルホン酸(MOBS)、3-[N-モルホリノ]プロパンスルホン酸(MOPS)、3-[N-モルホリノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(MOPSO)、ピペラジン-N,N'-ビス[2-エタンスルホン酸](PIPES)、ピペラジン-N,N'-ビス[2-ヒドロキシプロパンスルホン酸](POPSO)、N-トリス[ヒドロキシメチル]

メチル-4-アミノブタンスルホン酸(TABS)、N-トリス[ヒドロキシメチル]メチル-3-アミノプロパンスルホン酸(TAPS)、3-[N-トリス(ヒドロキシメチル)メチルアミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(TAPSO)、トリエタノールアミン(TEA)、N-トリス[ヒドロキシメチル]メチル-2-アミノエタンスルホン酸(TES)、N-トリス[ヒドロキシメチル]メチルグリシン(TRICINE)、トリエタノールアミン、トリス[ヒドロキシメチル]アミノメタン(TRIZMA)のリン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、ホウ酸塩および重炭酸塩が挙げられる。

#### 【0063】

さらに、バッファーは、遊離酸、塩基または塩の形であってよい。例えば、用いるバッファーが酸として存在するならば、バッファーは、例えば酸のナトリウム塩、二ナトリウム塩、ヘミナトリウム塩、ナトリウム塩水和物、カリウム塩、二カリウム塩、セスキナトリウム塩またはその他のいずれもの塩として存在する。バッファーが塩基として存在するならば、バッファーは、例えば遊離塩基の形態または塩酸塩として存在する。その他のバッファーを用いて核酸／遷移金属エンハンサー溶液を緩衝剤処理してもよい。本明細書で挙げたバッファーは、本発明の典型的な実施形態の例示に過ぎない。

#### 【0064】

本発明において開示した方法の好ましい実施形態では、核酸／遷移金属エンハンサー混合物の緩衝剤処理を行わず、pHも調整しない。さらに好ましい実施形態では、バッファーのpHは約4.0～約9.0間にある。いっそうさらに好ましくは、pHは約5.5～8.5間にある。

#### 【0065】

### 5.3 核酸／遷移金属エンハンサー中の核酸に対する遷移金属エンハンサーの比

#### 5.3.1 遷移金属エンハンサーに対する核酸の比および好ましい遷移金属エンハンサーの濃度

本発明の核酸／遷移金属エンハンサー混合物中の核酸に対する遷移金属エンハンサーの比は、本発明で使用してよい核酸のサイズが広範囲であるために莫大な範囲にわたって変動し得る。従って、導入する核酸の大きさにもよるが、核酸に対する遷移金属エンハンサーの比は、混合物中の核酸1万モルにつき遷移金属エ

ンハンサー約1モル～製剤中の核酸0.0001モルにつき遷移金属エンハンサー約1モルとなり得る。あるいは、製剤中の核酸に対する遷移金属エンハンサーの量を製剤中に存在する塩基対の数に関して計算してもよい。かかる場合、製剤中の遷移金属エンハンサーの量は、製剤中の塩基対1万モルにつき遷移金属エンハンサー約1モル～製剤中の核酸0.0001モルにつき遷移金属エンハンサー約1モルの範囲であってよい。

#### 【0066】

好ましい計算法では、核酸／遷移金属エンハンサー混合物に存在する遷移金属エンハンサーの量および核酸の量は独立に考慮される。核酸／遷移金属エンハンサー混合物の遷移金属エンハンサー濃度は、混合物が液体である場合、約0.01mM～250mMの範囲であってよい。より好ましくは、混合物の遷移金属エンハンサーの濃度は約0.1mM～約6.0mMである。混合物が凍結乾燥粉末である場合は、再構成した混合物の遷移金属エンハンサーの濃度は約0.01mM～250mMである。より好ましくは、再構成した混合物の遷移金属エンハンサーの濃度は0.1mM～約6.0mMである。

#### 【0067】

亜鉛など、本発明の遷移金属のいくつかは、たいていの生命体に存在する必須微量元素である。従って、本発明の遷移金属エンハンサーの中には、ほとんどの体液中、および他のin vivo環境中に見られるものがある。しかし、本発明で使用する遷移金属エンハンサーの濃度は、天然のin vivo環境に見られる遷移金属エンハンサーの濃度よりもかなり高い。例えば、食事量にもよるが、ヒト血液中の亜鉛の量は約880  $\mu\text{g}/100\text{mL}$ または約0.135mMである。例えば、Altmanら、Blood and Other Body Fluids, Federation of American Societies for Experimental Biology参照。かかる濃度は、本発明の核酸／遷移金属エンハンサー混合物中に必要な遷移金属エンハンサー濃度よりもかなり低い。

#### 【0068】

##### 5.3.2 投与する核酸の量

本発明の方法に従って適用する核酸の量は、限定されるものではないが、標的細胞の核酸摂取感受性、所望のタンパク質の発現レベル、もしあれば遺伝子治療

に必要な臨床状態などいくつかの要因によって大きく変化する。例えば、ヒトの唾液腺に注入する核酸の量は、一般に約 $1\mu\text{g}\sim 200\text{mg}$ 、好ましくは約 $100\mu\text{g}\sim 100\text{mg}$ 、より好ましくは約 $500\mu\text{g}\sim 50\text{mg}$ 、最も好ましくは約 $20\text{mg}$ である。例えば、ヒトの脾臓に注入する核酸の量は、例えば約 $1\mu\text{g}\sim 750\text{mg}$ 、好ましくは約 $500\mu\text{g}\sim 500\text{mg}$ 、より好ましくは約 $10\text{mg}\sim 200\text{mg}$ 、最も好ましくは約 $40\text{mg}$ である。ヒトの遺伝子治療に好適な核酸の量は、動物モデルにおける遺伝子治療で効果的な核酸の量から推定できる。例えば、ヒトにおける遺伝子治療に有効な核酸の量は、ラットにおける遺伝子治療に有効な核酸の量の約 $100\sim 200$ 倍であることが知られている。さらに、細胞のトランスフェクションを達成するために必要な核酸の量は、採用するトランスフェクション法の効率の増加に応じて減少する。ある好ましい実施形態では、最終混合物中の核酸の総濃度は約 $0.1\mu\text{g/ml}\sim 15\text{mg/ml}$ である。

#### 【0069】

##### 5.3.3 投与するカチオン性脂質の量

本発明のいくつかの実施形態では、核酸をカチオン性脂質および遷移金属と混合してカチオン性脂質/DNA/遷移金属混合物を形成するものもある。次いでこのカチオン性脂質/DNA/遷移金属混合物を目的とする標的細胞をトランスフェクトするのに用いる。特に、カチオン性脂質を遷移金属と一緒に用いることが核酸の *in vitro* トランスフェクションに特に有効であることが分かっている。

#### 【0070】

核酸をカチオン性脂質/DNA/遷移金属混合物の形態で標的細胞に送達する実施形態において、好ましい核酸濃度は $0.1\sim 25\mu\text{g}/\mu\text{L}$ の範囲である。より好ましくは核酸濃度は $0.5\sim 10\mu\text{g}/\mu\text{L}$ である。さらに、遷移金属濃度は好ましくは約 $0.01\sim 10\text{mM}$ である。しかし、有効な遷移金属濃度の正確な範囲は、主として溶解度など、用いる固有の特徴をもつ特定の遷移金属によって決まる。

#### 【0071】

本発明は、(i) 単一形態のカチオン性脂質、(ii) カチオン性脂質成分および中性脂質成分を含む脂質混合物、または(iii) 種々のカチオン性脂質混合物を含むリポソーム溶液を包含する。カチオン性脂質成分および中性脂質成分を含む脂質混合物の例は、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンおよびコレステロ

ールである。本明細書においてカチオン性脂質とは広義に解釈され、限定されるものではないが、有用な生理学上のpHで正味の正電荷を有する第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、または第四級アミン基などの官能基を含む脂質などが挙げられる。カチオン性脂質の例としては、1:1 N,N-[ビス(2-ヒドロキシエチル)]-N-メチル-N-[2,3-ビス(テトラデカノイルオキシ)プロピル]アンモニウムクロリドおよびN,N,N',N'-テトラメチル-N,N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2,3-ビス(9(z)-オクタデセノイルオキシ)-1,4-ブタンジアニウムヨードが挙げられる。別のカチオン性脂質としてはThe Lipid Handbook, Gunstone, Harwood, and Padley(eds.), Second Edition, July 1994, CRC Pressなどの参考文献に見出せる。

#### 【0072】

本発明のいくつかの実施形態では、カチオン性脂質/DNA/遷移金属混合物に存在するリポソームの量をカチオン性脂質：DNAリン酸の電荷比という形で表現するものもある。例示的な複合体としては、電荷比0.5、0.75、1.0および2.0を有するものが挙げられる。好ましくは、このカチオン性脂質：DNAリン酸電荷比は、0.01～12の範囲である。さらに好ましくは、この脂質：DNAリン酸電荷比は0.1～6の範囲である。さらに一層好ましくは、この脂質：DNAリン酸電荷比は0.5～4の範囲である。

#### 【0073】

先行技術の系に優る本発明の重要な利点は、脂質：DNAリン酸電荷比の低い（すなわち、1未満の）リポソームが、細胞へ核酸を送達する際にさらに有効なことである。

#### 【0074】

### 5.4 送達され得る核酸

本発明に記載の核酸/遷移金属エンハンサーを形成するのに用いる核酸には、DNA、DNAベクター、RNA、および合成オリゴヌクレオチドが挙げられる。これらの核酸は全て天然に存在するかまたは分子生物学および化学の分野で公知の技術により構築または修飾してもよい。核酸は環状または直鎖形として存在してよく、またあるいは分枝していてもよい。核酸は一本鎖、二本鎖、または、より複雑な



構造の別の形態であってもよい。核酸は、正、中性、または負の電荷を有してよいが、最も好ましいのは負電荷である。好ましい実施形態では、核酸のサイズの範囲に制限はない。さらに一層好ましい実施形態では、核酸は約10ないし約20,000ヌクレオチド長である。ある好ましい実施形態では、核酸は約100ないし約10,000ヌクレオチドである。さらに一層好ましい実施形態では、核酸は約500ないし約5,000ヌクレオチドからなる。

#### 【0075】

##### 5.4.1 核酸供給源としてのDNAベクターの使用

本発明に従って核酸/遷移金属エンハンサー混合物を形成するのに使用できるDNAベクターは、典型的には当業界で十分公知の標準の組換えDNA技術を用いて異種DNA供給源から構築される。DNAウイルスベクター、細菌ベクター、および真核生物および原核生物の宿主の双方において複製の可能なベクターなど、種々の公知のベクターは本発明に従って使用できる。所望する結果に応じて、特定の染色体中の特異的な部位へのベクターDNAの安定した組み込みを仲介する配列をベクターに含めてもよい。かかる組み込みは、ベクター内に含まれる遺伝子の長期にわたる安定発現を可能にし、かつ/または有益なゲノム内の変化を可能にするものであり得る。あるいは、ベクターを細胞のゲノム内に挿入しないように設計してもよい。ゲノム内に挿入しないベクターは細胞内で複製を可能にする配列を含んでもよいし、含まなくてもよい。従って、DNAベクターの配列内に含める構成エレメントを変えることにより、細胞内のベクターの安定性およびコピー数を望むままに制御できる。

#### 【0076】

本発明に有用なベクターは、典型的には1以上の当該遺伝子または遺伝子断片を有し、ベクターを標的細胞へ導入して1以上の遺伝子産物の発現を可能にする。これらの遺伝子に加えて、特異的な生育条件下でベクターDNAを有する細胞の選択を可能にするため、またはベクター配列を持つ細胞の同定を可能にするために、ベクターは1以上のマーカー遺伝子を含んでもよい。導入された遺伝子または遺伝子断片の発現は、所望の結果およびベクターの構成に応じて種々の方法で制御できる。遺伝子は細胞内で構造上種々のレベルで発現させてよく、あるいは

特異的な生理学的条件下または特異的な細胞型でのみ発現させてもよい。発現は遺伝子より上流のプロモーター領域の存在によって決まり、エンハンサー領域およびゲノムDNAのベクター内または隣接領域内の他の調節エレメントによって制御してもよい。遺伝子治療のためのDNAベクターの構築、ならびにベクターの複製、ベクターの細胞ゲノムへの挿入、およびベクターによって運搬される遺伝子の発現に必要なエレメントは当技術分野で十分公知である。Curieら、*Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 14:1, 1996; Germanら、特許第5,837,693号参照。

#### 【0077】

DNAベクターにより運搬される遺伝子からの1次発現産物はRNAである。標的細胞が特定の転移RNAまたはリボソームRNAを欠く場合、ベクターが所望の転移またはリボソームRNAをコードする遺伝子を直接供給することによってこの欠失を補完してよい。しかし、最も典型的には、ベクターDNAにより運搬される遺伝子から発現したRNAはメッセンジャーRNAとして機能し、タンパク質またはタンパク質断片をコードする。このタンパク質の基本構造内に含まれる標的配列に応じて、発現したタンパク質は細胞から分泌されるか、細胞内オルガネラの1つに輸送されるか、またはサイトゾル内に留まる。発現したタンパク質内のアミノ酸配列も、タンパク質の翻訳中または翻訳後にタンパク質へ別の修飾を指示するものであってよい。ベクターDNAから発現したタンパク質は標的細胞または生物体内の他の細胞に治療効果を与えるものであってよい。

#### 【0078】

DNAベクターにより運搬された遺伝子から生じたRNAの配列および安定性にもよるが、RNAは細胞内でアンチセンス活性を有してもよい。アンチセンスオリゴヌクレオチドは典型的に細胞内のmRNA分子と特異的に結合して、結合したmRNAの安定性または翻訳効率を向上または低下させるように設計される。しかし、当業者ならば、他のRNA分子およびゲノムのDNAなど、他の核酸の形態もまたアンチセンス法により標的にしてよいことが分かるであろう。アンチセンスRNAが相補的であり標的配列はウイルスまたは病原微生物に由来してよく、DNAベクターによってコードされ、本発明の方法により標的細胞へ送達されるアンチセンスRNAの発現は、ウイルスまたは病原微生物により生じる感染からの保護および/または治

療を提供し得る。あるいは、アンチセンスRNAが相補的である標的配列は標的細胞自身によりコードされていてもよく、アンチセンスRNAの発現は標的細胞中の標的遺伝子の異常発現に起因する疾患の状態から生物体を保護し得る。標的遺伝子には種々の癌遺伝子、癌原遺伝子、ならびにアルツハイマー病に関連するアミロイド様タンパク質、プリオンタンパク質などをコードする遺伝子などが挙げられる。Padmapriyaら、特許第5,929,226号参照。

#### 【0079】

DNAベクターによって運搬された遺伝子から作成されたRNAもリボザイムとして働く。リボザイムは他のRNA分子中のリン酸ジエステル結合の加水分解を触媒するRNA分子である。その結果リボザイムは結合する標的RNAの活性を阻害および/または低下させ得る。リボザイムは遺伝子治療においてアンチセンスRNA分子に比して著しい利点を2つ提供する。第1に、リボザイムの活性が触媒作用であり、従って個々のリボザイム分子が多くの標的RNAを開裂できるため、リボザイムはアンチセンスRNAよりも効率的であり、その結果、低濃度でも効果的である。第2に、個々のミスマッチはリボザイムの触媒活性を崩壊させ得るがアンチセンスRNAの非標的RNAへの結合を必ずしも阻害しないので、リボザイムの活性の特異性はアンチセンスRNAの特異性よりも大きい。Chowriraら、特許第5,837,855号参照。

#### 【0080】

##### 5.4.2 核酸供給源としてのRNAの使用

DNAベクターにより運搬された遺伝子に由来する、対象とするRNAの発現は可能であるが、RNA自身を用いて核酸/遷移金属エンハンサー混合物を形成することが本発明の目的には望ましい。大量のRNAは典型的には細胞を含まない系において種々のRNAポリメラーゼを用いて直鎖DNAの鋳型からの転写により生成できる。DNAの鋳型は分子生物学の当業界に公知の技術を用いて所望のRNA配列をコードするように構築される。発現される遺伝子は一般に、その5'末端のRNAポリメラーゼ特異的プロモーターと、3'末端のポリA尾部および転写終結配列をコードする鋳型によりフランキングされている。この遺伝子は5'キャップおよび4つのヌクレオシド三リン酸の存在下でRNAポリメラーゼにより転写される。このポリメラー

ぜおよび組み込まれない小さい分子を取り除くため、転写に続いてRNAを精製するのが望ましい。さらに、RNA分子をヌクレアーゼの消化から保護し、細胞内の安定性を高めるために、種々の化学法および酵素法を用いて、核酸/遷移金属エンハンサー溶液中に含まれるRNA分子を修飾することができる。可能な方法には末端修飾および環化が挙げられる。Felgnerら、特許第5,703,055号参照。

#### 【0081】

いずれの方法で生成したRNAも核酸/遷移金属エンハンサー混合物を生成するのに使用でき、本発明の方法により標的細胞への送達が可能である。転移RNAおよびリボソームRNAはこれらの分子の量が十分でない細胞へ送達できる。同様に、メッセンジャーRNAを細胞内に送達して、それらのコードしたタンパク質の発現を可能にすることができる。さらに、RNAポリメラーゼにより生成したアンチセンスRNA分子およびリボザイムを標的細胞へ送達して所望の治療効果をもたらすことができる。

#### 【0082】

レトロウイルスベクターまたは改変レトロウイルスベクターの形態のRNAもまた本発明の核酸/遷移金属エンハンサー混合物の形成に使用できる。レトロウイルスはRNAの形態中にその遺伝情報を有し、真核細胞中で当該の遺伝子または遺伝子断片を発現するのに使用できる。細胞に進入する際、レトロウイルスRNAはDNAへ逆転写され、続いてこのDNAが感染細胞のゲノムDNAにインサートされる。レトロウイルスにより運搬され、適当なプロモーターの制御下に置かれた遺伝子または遺伝子断片は、従って、上記でDNAベクターについて記載したように細胞内での発現が可能である。

#### 【0083】

##### 5.4.3 合成オリゴヌクレオチドおよび類似体の核酸源としての使用

本発明に従う方法により、合成オリゴヌクレオチドおよび/または類似体を用いて核酸/遷移金属エンハンサー混合物を生成させてもよい。特に、標準の固相化学法により合成したオリゴヌクレオチドを用いてよい。これらの分子はさらに非天然の核酸塩基類似体、糖類似体または結合を含んでもよく、また混合物生成前に化学的方法によって修飾してもよい。これらの改変はオリゴヌクレオチドの

標的細胞への送達の改善または細胞内でのオリゴヌクレオチドの安定性の向上など、オリゴヌクレオチドの1以上の望ましい特性の改良となる。Padmapriyaら、特許第5,929,226号参照。

#### 【0084】

オリゴヌクレオチドの複素環式塩基には、天然に存在する塩基(アデニン、シトシン、グアニン、チミン、およびウラシル)、またはこれらの塩基の合成修飾物または類似体が挙げられる。オリゴヌクレオチドの糖成分には天然に存在する糖(リボースおよび2'-デオキシリボース)またはこれらの糖の合成修飾物または類似体が挙げられる。さらに、糖のアノマー構造および糖に対する塩基のカップリング位置さえ、本発明の核酸/遷移金属エンハンサー混合物を作成するのに用いるオリゴヌクレオチドにおいて天然であっても非天然であってもよい。最終的に、ヌクレオチド間の結合、修飾したヌクレオシド、またはオリゴヌクレオチド内のヌクレオシド類似体には、天然に存在する結合(5'→3'リン酸ジエステル)またはこの結合の合成修飾物または類似体が挙げられる。当業者であれば、多くのヌクレオシド、修飾したヌクレオシド、またはヌクレオシド類似体は従来技術にて公知であり、これらのいずれもが単独または組み合わせて用いることができ本発明で思料される核酸/遷移金属エンハンサー混合物に使用するためのオリゴヌクレオチドを生成することができることが分かるであろう。

#### 【0085】

オリゴヌクレオチドのデザインおよび合成は同様に細胞内でのオリゴヌクレオチドに所望する効果に応じて変化する。上記でアンチセンスRNAについて記載した通り、アンチセンスオリゴヌクレオチドは標的mRNAと特異的に結合するように設計でき、その結合は結合したmRNAの安定性または翻訳効率を向上または低下させるものであってよい。標的にもよるが、この方法はウイルスまたは病原微生物による感染を制御するのに使用でき、あるいは望ましい特性または望ましくない特性を有する細胞の増殖を調節するのに用いることができる可能性がある。あるいは、オリゴヌクレオチドは、二本鎖DNAを認識してそれに結合するように設計してよく、この結合の結果として形成された三重螺旋が、この方法により標的にされる遺伝子の発現を変えるかもしれない。最終的に、本発明の方法によって細

胞内に送達されたオリゴヌクレオチドは新規の触媒作用または結合能など新しい機能を有してもよく、従来技術に公知の機能に限定されるものではない。

#### 【0086】

#### 5.5 核酸/遷移金属エンハンサー混合物の投与

in vivoでの遺伝子治療法をめざす実施形態など、本発明の実施形態の中には、核酸/遷移金属エンハンサー混合物を当該の生物体内の細胞へ直接投与してよいものもある。この場合、投与量は治療される被験者の状態および大きさならびに治療頻度および投与経路により変化する。好適な投与量および投与頻度をはじめ慢性治療プロトコールに望ましい投与計画は、信頼できる臨床判断に照らして患者のエンハンサーに対する初期応答を指標とできる。特定の細胞、例えば鼻粘膜、咽喉、気管支組織または肺への投与にはエアロゾル製剤の吸入など他の非経口経路が必要とされるが、実施形態の中には直接または血流を経由して間質域へ注入する非経口経路を用いるものもある。

#### 【0087】

好ましい実施形態では、水性の担体中に核酸および遷移金属エンハンサーを含んでなる製剤を部位あたり約10 $\mu$ Lから部位あたり約100mL量にてin vivoで組織内へ注射する。

#### 【0088】

#### 5.6 種々の組織への代表的な核酸送達法

##### 5.6.1 分泌腺への核酸送達

本発明の方法を用いて、例えばGermanら、特許第5,885,971号に記載のものなどの投与経路を用いて種々の分泌腺へ核酸を送達してもよい。本明細書中で用いているように、分泌腺は通常の代謝必要物に関係しない物質を専門に分泌または放出する細胞の集合体として定義される。分泌腺には、唾液腺、脾臓、乳腺、甲状腺、胸腺、下垂体、肝臓、および当業者に十分公知のその他の腺などが挙げられる。

#### 【0089】

ある実施形態では、本発明の方法を核酸を唾液腺へ送達するのに用いる。本明細書中で唾液腺は、口腔の大唾液腺(集合的に、耳下腺、舌下腺、および顎下腺)

ならびに舌、唇、頬、および口蓋（唇、頬側、臼歯、上顎、舌、および前舌腺）の小唾液腺など唾液を分泌する口腔の腺として定義される。

#### 【0090】

本クレームの核酸/遷移金属エンハンサー混合物のための、Germanらにより記載の投与経路には公知のin vivoまたはex vivo法に従う投与が含まれる。in vivo法を用いる場合、核酸/遷移金属エンハンサー混合物は分泌腺または分泌腺の導管へ直接注入してよい。その後分泌腺を核酸/遷移金属エンハンサー混合物へ曝す結果、分泌腺からなる集合体内に存在する標的細胞によって核酸が摂取される。

#### 【0091】

あるいは、ex vivo法を用いて核酸を上記に記載の分泌腺のいずれかに導入する場合、分泌腺組織の生検を、対象とする生物体から得てもよい。好ましい実施形態では、この生物体は哺乳類である。好ましくは生検を用いて既知の技術に基づいて第1次細胞培養を確立する。次ぎに生検組織または第1次細胞培養に核酸/遷移金属エンハンサー混合物を加え、分泌腺細胞の細胞内環境へ核酸を取り込ませる。核酸/遷移金属エンハンサーに曝された細胞を次ぎに生物体内の分泌腺へ再導入する。

#### 【0092】

核酸が、当業者らに公知の一定の型のレトロウイルス配列を含む場合、この核酸の一部もまた分泌腺細胞のゲノム内へ組み込んでよい。外因性の核酸の分泌腺細胞ゲノムへの組み込みは、典型的にはプロモーターへ機能的に形で連結された核酸の一部の安定した転写を生じる。しかし、好ましい実施形態では、核酸/遷移金属エンハンサー混合物中の核酸はレトロウイルス配列を含まず、一時的に転写されるだけである。

#### 【0093】

核酸が細胞によって転写され、ポリペプチドをコードする場合、次ぎにそのポリペプチドは遺伝子送達後に細胞の仕組みによって発現する。ポリペプチドは機能タンパク質であってよく、分泌細胞から血流、胃腸系または間質、あるいは生物体の内部または外部コンパートメントへ分泌される。従って、本発明の方法は

新たに転写されたペプチド産物を添加することにより宿主生物体で血流中の種々の対象とするタンパク質を補うのに用い得るであろう。かかる用途は、例えばGermanら、特許第5,837,693号に記載の疾患など、広範囲の疾患の治療に役立つ。従って、核酸/遷移金属エンハンサー混合物中の核酸によりコードされるタンパク質の代表例としては、限定されるものではないが、インスリン、ヒト成長ホルモン、エリトロポエチン、凝固因子VII、ウシ成長ホルモン、血小板由来増殖因子、凝固因子VIII、トロンボポエチン、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-1 RA、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、繊維芽細胞増殖因子、神経突起増殖因子、顆粒球コロニー刺激因子、L-アスパラギナーゼ、ウリカーゼ、キモトリプシン、カルボキシペプチダーゼ、スクラーゼ、カルシトニン、Ob遺伝子産物、グルカゴン、インターフェロン、トランスフォーミング成長因子、毛様体神経突起トランスフォーミング因子、インスリン様増殖因子-1、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、脳由来神経突起因子、インスリントロピン、組織プラスミノゲンアクチベーター、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、アデノシンデアミダーゼ、カルシトニン、アルギナーゼ、フェニルアラニンアンモニリアーゼ、 $\gamma$ -インターフェロン、ペプシン、トリプシン、エラスターゼ、ラクターゼ、内因子、コレシストキニン、およびインスリントロフィックホルモンが挙げられる

#### 【0094】

##### 5.6.2 脳への核酸送達

本発明に従う方法は、Felgnerらの特許第5,580,859号およびSedlacekらの特許第5,916,803号に記載の投与経路を用いて脳組織の種々の所望の領域へ核酸を送達するのに用いてよい。本明細書中で用いるように、脳組織は、限定されるものではないが、ニューロン、シュワン細胞、グリア細胞および星状細胞などの細胞の集合体として定義される。かかる細胞は中枢神経系または末梢神経系に関する種々の機能を専門におこなう特性を持つことが知られている。本クレームの発明の方法に従って用いられる製剤も、既に記載した公知のアプローチを用いて種々の神経細胞へ導入してよい。

#### 【0095】



ある実施形態では、脳組織は、例えば上記ポリペプチドをコードする配列を含んでなる遺伝子構築物の注入後、成体マウスから単離してよい。ある実施形態では、プロモーターはポリヌクレオチドなどの分子をコードする配列と機能的に関連する。より具体的には、本発明に従い実施され得る他の分子は、当業界で公知の治療上有効なタンパク質をコードするゲノムDNA、cDNA、およびmRNA、遺伝子の転写産物を不活化するのに有効なリボソームRNA、アンチセンスRNAまたはDNAポリヌクレオチドなどのポリヌクレオチド、あるいはレトロウイルス核酸でもよい。注入は本明細書中に記載の種々の投与経路から所望の領域、例えば、両側の頭頂、前頭、側頭、または視覚野領域の各々へ投与してよい。遺伝物質の注入後、本明細書中に開示の方法に基いて組織をアッセイしてよい。遺伝子発現の分析における遺伝物質の首尾よい導入は、例えば、ニューロンおよび/または関連の神経細胞、ならびに脳細胞、シュワン細胞、グリア細胞および星状細胞などの組織の形成、成長、増殖、分化、維持を誘導、増大および/または阻害するための治療計画指示するのに必要な情報を与える。

#### 【0096】

すでに記載した通り、この核酸は、神経細胞のゲノムへの組み込みが可能な所望のレトロウイルス配列または種々の外因性核酸配列のいずれをも含んでよく、その結果核酸の一部が安定して転写される。しかし、好ましい実施形態では、核酸/遷移金属エンハンサー混合物中の核酸はレトロウイルス配列を含まず、一時的に転写されるだけである。あるいは、核酸が細胞の仕組みによって発現するようなポリペプチドをコードする。このポリペプチドは機能タンパク質であってよく、脳内で脳細胞から間質へ分泌される。従って、本発明の方法を、上記に記載の方法で新しく転写されたペプチド産物を添加して宿主生物体内に存在する種々のタンパク質を補うのに用いてよい。

#### 【0097】

本発明のもう1つの実施形態は、ニューロンおよび/または関連のシュワン細胞、グリア細胞および星状細胞に関連する神経細胞および神経組織の疾患、ならびに神経および神経組織の疾患または疾病に関するその他の症状の治療のための治療法および組成物である。本発明はさらに神経組織の修復および回復のための治

療法にも向けられる。

#### 【0098】

さらに、本発明の方法はニューロン細胞、グリア細胞および星状細胞の生き残りを向上させ、その結果ニューロンの生き残りの減少を生じることが知られている症状の治療のための既知の移植プロトコールに大いに有効であると考えられる。

#### 【0099】

##### 5.6.3 筋肉への核酸送達

本発明の方法は、米国特許第5,580,859号および同5,916,803号に記載の投与経路を用いて核酸を筋肉組織の種々の所望な領域へ送達するのに用いてよい。本明細書中で用いるように、筋肉組織は一般に、限定されるものではないが、心筋細胞、骨格筋および平滑筋細胞など身体の筋肉組織の大半をなす細胞の集合体として定義される。かかる細胞は、他の筋肉組織の別の公知の機能と同様に、一般に、動作に関する種々の機能を専門に行う特性を持つことが知られている。本出願にて特許請求する発明の方法に従って用いられる製剤も、上記の公知のアプローチを用いて種々の筋肉細胞へ導入してよい。

#### 【0100】

ある実施形態では、筋肉組織は、例えばポリペプチドをコードする配列を含んだ遺伝子構築物の注入後、成体マウスから単離してよい。ある実施形態では、プロモーターを、ポリペプチドをコードする配列と機能し得る形で結合する。

#### 【0101】

より具体的には、本発明に従い実施され得る他の分子は、すでに記載したものと同様であってよい。

#### 【0102】

本発明に従う核酸/遷移金属エンハンサー混合物の投与は、生物体内の特定の筋肉群などの所望の領域またはかかる筋肉群内の特定の部位へ行ってよい。遺伝物質の注入の後、既に記載した方法に従って筋肉組織をアッセイしてよい。測定可能な遺伝子発現によって立証される遺伝物質の首尾よい導入は、例えば、心筋細胞、骨格筋および平滑筋細胞を含む骨格筋組織の種々の細胞の形成、成長、増

殖、分化、維持の誘導、増強および/または阻害などの治療法の開発に有効な情報を与える。

#### 【0103】

すでに記載した通り該核酸は、筋肉細胞のゲノムへの組み込みが可能な所望のレトロウイルス配列または種々の外因性核酸配列のいずれを含んでもよく、その結果、核酸の一部が安定して転写される。しかし、好ましい実施形態では、核酸/遷移金属エンハンサー混合物中の核酸はレトロウイルス配列を含まず、一時的に転写されるだけである。あるいは、核酸は細胞の機構によって発現するようなポリペプチドをコードする。該ポリペプチドは機能タンパク質であってよく、筋肉細胞による脳の間質へ分泌されてよい。従って、本発明の方法を、上記に記載の方法で新しく転写されたペプチド産物を添加して宿主生物体内に存在する種々のタンパク質を補うのに用いてよい。

#### 【0104】

本発明の別の実施形態は、筋細胞および/または関連する筋肉細胞ならびに心筋細胞、骨格筋および平滑筋細胞などの組織の疾患、ならびに筋肉組織の疾患または疾病に関するその他の症状の治療のための治療法である。本発明はさらに筋肉組織の修復および回復のための治療法にも向けられる。

#### 【0105】

さらに、本発明の方法は、筋細胞の生存を高め、そしてそれゆえに公知の移植法、および関連の組織に何らかの退化を引き起こすことが知られている症状の治療に有用であり得る。

#### 【0106】

#### 5.6.4 膵臓への核酸送達

本発明の方法は核酸を米国特許第5,580,859号および同5,916,803号に記載の投与経路を用いて膵臓組織の種々の所望の領域へ送達するために使用できる。本明細書において、膵臓組織とは内分泌部分（内分泌部）と外分泌部分（外分泌部）とを含んでなるものと定義される。内分泌部はランゲルハンス島を含み、外分泌部は腺房細胞を含む。一般に、膵臓は細胞の集合体と定義され、限定されるものではないが、腺管細胞、腺房細胞、 $\beta$ 細胞、 $\alpha$ 細胞、およびランゲルハンス島の

その他の細胞をはじめとする全臓器構造を含んでなる。かかる細胞は、消化作用、ホルモン調節、およびその他の公知の機能に通常関係する種々の機能を遂行するよう特化された能力を有することが知られている。

【0107】

本出願にて特許請求する発明の方法に従って記載される組成物も、前記の公知のアプローチを用いて種々の臓器細胞に導入できる。本出願にて特許請求する核酸/遷移金属エンハンサー混合物のためには、Germanらによって記載される投与経路を公知のex vivoまたはin vivo法に従って用いる。

【0108】

ある実施形態では、本発明に従って、遺伝子構築物組成物の注射の成功後に臓器組織を成体マウスから単離できる。遺伝子構築物は、例えば、ポリペプチドをコードする配列を含んでなってもよい。ある実施形態では、プロモーターが、ポリペプチドをコードする配列と機能し得る形で結合されている。より詳しくは、本発明に従って実施され得るその他の分子はこれまでに記載されたものと同様であり得る。

【0109】

本発明に従う核酸/遷移金属エンハンサー混合物の投与は、臓器内の特化した細胞群などの臓器構造の所望の領域に行ってもよい。遺伝子材料の注射後、臓器組織は、タンパク質レベルを定量するよう設計された公知の方法または遺伝子発現の増加を検出するためのその他の方法に従ってアッセイしてもよい。測定可能な遺伝子発現によって証明される遺伝子材料の導入の成功は、例えば、腺房細胞、 $\beta$ 細胞、 $\alpha$ 細胞、腺管細胞、およびランゲルハンス島のその他の細胞を含む臓器の種々の細胞の形成、成長、増殖、分化、維持を誘導、増強および/または阻害するといった治療法の開発に有用な情報を提供し得る。

【0110】

核酸が細胞によって転写され、かつ、ポリペプチドをコードする場合には、ポリペプチドは遺伝子送達後に細胞の機構によって発現され得る。ポリペプチドは機能性タンパク質である場合もあり、臓器細胞によって血流、胃腸系または間質空間または生物のその他の内部もしくは外部コンパートメントのいずれかへ分泌

される場合もある。従って、本発明の方法は、新規に転写されるペプチド産物を加えることによって宿主生物に血流中の注目される種々のタンパク質を補充するために使用できる。かかる適用は、例えば、Germanら、米国特許第5,837,693号に記載されるものなどの広範な疾病の治療に有用性を提供する。従って、核酸/遷移金属エンハンサー混合物中の核酸によってコードされ得るタンパク質の代表的な例としては、限定されるものではないが、インスリン、ヒト成長ホルモン、エリスロポエチン、凝固因子VII、ウシ成長ホルモン、血小板由来増殖因子、凝固因子VIII、トロンボポエチン、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-1RA、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、繊維芽細胞増殖因子、神経突起増殖因子、顆粒球コロニー刺激因子、L-アスパラギナーゼ、ウリカーゼ、キモトリプシン、カルボキシペプチダーゼ、スクラーゼ、カルシトニン、Ob遺伝子産物、グルカゴン、インターフェロン、トランスフォーミング増殖因子、毛様体神経突起トランスフォーミング因子、インスリン様増殖因子-1、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、脳由来神経突起因子、インスリントロピン、組織プラスミノゲンアクチベーター、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、アデノシンデアミダーゼ、カルシトニン、アルギナーゼ、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ、 $\chi$ -インターフェロン、ペプシン、トリプシン、エラスターゼ、ラクターゼ、内因子、コレシストキニン、およびインスリン向性ホルモンが挙げられる。

#### 【0111】

本発明のもう1つの実施形態は、膵臓細胞変性が関係する疾患および膵臓組織疾患または疾病と関係する他のいずれかの症状を治療するための治療法である。本発明はさらに、欠陥のある膵臓組織の修復および回復のための治療法に向けられる。

#### 【0112】

さらに本発明の方法は、膵臓細胞の生存を増加させ、そしてそれゆえに既知の移植処置に、および関連組織に何らかの変性を引き起こすと知られている症状の治療のために有用であり得ると考えられる。

#### 【0113】

#### 5.6.5 その他の組織タイプへの核酸送達

本発明は、標的細胞への治療上有効量の核酸の細胞内送達を容易にする、核酸/遷移金属エンハンサー混合物を用いる方法を提供する。本出願にて特許請求する治療的エンハンサーおよび遺伝子送達における使用法は、限定されるものではないが、乳房、甲状腺、骨、膀胱、皮膚、肝臓、胃、肺、腎臓、胃腸管、および精巣、子宮および卵巣などの種々の生殖器に関係する細胞群を含むその他の細胞タイプに関する使用にさらに好適であり得る。その後の遺伝子発現をもたらす遺伝子材料の導入の成功は、例えば、上記の組織の種々の細胞の形成、成長、増殖、分化、維持を誘導、増強および/または阻害するといった治療法の開発のための有用な情報を提供し得る。

#### 【0114】

これまでに記載したように、核酸はいずれかの所望のレトロウイルス配列または筋細胞のゲノムに組み込まれて、核酸の部分の安定な転写をもたらす得る種々の外来核酸配列を含み得る。しかしながら、好ましい実施形態では、核酸/遷移金属エンハンサー混合物中の核酸はいずれのレトロウイルス配列も含まず、一時的に転写されるにすぎない。あるいは、核酸は細胞の機構によって発現され得るポリペプチドをコードする。ポリペプチドは機能性タンパク質である場合もあり、また筋細胞によって脳内間質空間に分泌される場合もある。従って、本発明の方法は新規に転写されるペプチド産物を上記のように加えることによって宿主生物内に存在する種々のタンパク質を補充するために使用できる。

#### 【0115】

#### 5.7 核酸/遷移金属エンハンサー溶液の投与経路

核酸/遷移金属エンハンサー混合物は、核酸を細胞に直接または間接のいずれかで暴露できるいずれの方法を用いて標的組織および/または細胞に適用してもよい。当業者ならば、「裸の」（遊離）核酸送達のための投与経路を記載する参照文献は本発明の方法に十分に適しているということが分かるであろう。本発明の方法を実施するためにいずれの公知の代表的な投与法を適用してもよいと考えられる。ある実施形態では、核酸/遷移金属エンハンサー混合物を例えば、Riveraら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:8657, 1999および/またはMcCluskieら

、Mol. Med. 5:287, 1999から導かれる方法を用いて筋肉内投与してもよい。従って、核酸/遷移金属エンハンサー混合物をBennertら, J. Med. Chem. 40:4069, 1997および/またはMeyerら, Gene. Ther. 2:450, 1995によって記載されるものから採用した方法を用いて気管内投与してもよい。さらにもう1つの実施形態では、核酸/遷移金属エンハンサー混合物をMcCluskieら, 同上、および/またはReimerら, J. Pharmacol. Exp. Ther. 289:807, 1999によって記載される方法から採用した方法を用いて腹腔内投与してもよい。また、核酸/遷移金属エンハンサー混合物をMcCluskieら, 同上および/またはWatanabeら, J. Immunol. 163:1943, 1999によって記載される方法から採用した方法を用いて皮内投与してもよい。もう1つの実施形態では、核酸/遷移金属エンハンサー混合物をMcCluskieら, 同上および/またはWangら, J. Clin. Invest. 95:1710, 1995によって記載される方法から採用した方法を用いて静脈内投与してもよい。さらにもう1つの実施形態では、核酸/遷移金属エンハンサー混合物をMcCluskieら, 同上に記載の種々の方法を適応させて、会陰内、皮下、舌下、腔壁を介して、鼻腔内滴下注入によって、直腸内、眼へ、腺管内、または経口投与してもよい。さらにもう1つの実施形態では、核酸/遷移金属エンハンサー混合物をMcCluskieら, 同上またはKulkinら, J. Virol., 71:3138, 1997に記載される方法を適応させて鼻腔内吸入によって投与してもよい。核酸/遷移金属エンハンサー混合物はまた、McCluskieら, 同上またはWangら, Vaccine 15:821, 1997によって記載される方法を適応させて腔内投与してもよい。さらに、核酸/遷移金属エンハンサー混合物は、Yuら, J. Invest. Dermatol. 112:370, 1999によって記載される投与経路を適応させて局所投与してもよい。

#### 【0116】

#### 5.8 治療用製剤

ある実施形態では、核酸/遷移金属エンハンサー混合物は本発明の方法に従ってアンプル、複数回用量容器、またはその他の医薬上許容される投与形で提供される単位投与形に製造できる。核酸/遷移金属エンハンサー混合物は油性または好ましくは水性ビヒクル中の懸濁液、溶液、またはエマルションなどの形態で存在してよい。あるいは、核酸/遷移金属エンハンサー混合物は凍結乾燥させて凍

結乾燥品を形成してもよい。凍結乾燥品は送達時に滅菌パイロジェンフリー水などの好適なビヒクルで水和してもよい。液体ならびに再構成され得る凍結乾燥形態のいずれも、薬剤、好ましくは緩衝剤を注射用液のpHを好適に調節するのに必要な量で含んでなる。いずれかの非経口使用で、特に製剤が静脈内投与される場合には、溶質の総濃度は等張またはわずかに高張の望ましい製剤を作製するように調節すべきである。張性を調節するには糖などの非イオン性材料が好ましく、スクロースが特に好ましい。これらの形態のいずれもが、デンプンまたは糖、グリセロールまたは生理食塩水などの好適な処方剤をさらに含み得る。液体または固体にかかわらず単位用量当たりの組成物は0.1%~99%の核酸を含み得る。

#### 【0117】

使用に先立って核酸が充填される単位用量アンプルまたは複数回用量容器は、その医薬上有効な用量または有効な用量の倍数に好適な量の核酸または核酸含有溶液を入れた密閉容器を含み得る。ポリヌクレオチドは無菌製剤として詰められ、密閉容器は使用まで製剤の無菌性を保つよう設計される。

#### 【0118】

好ましい実施形態では、核酸/遷移金属エンハンサーが詰められる容器は、公知の適正製造基準(GMP)に準拠するプロトコルの用法を用い、連邦食品医薬品化粧品法の適切な項(section) (「FDCA」:Title 21、米国成文法)に従って適切に表示する。

#### 【0119】

### 6. 実験

#### 6.1 実験法

以下の実験は当業者に本発明の実施法を開示および説明するよう意図されるものであり、本発明者が本発明と考えるものの範囲を限定しようとするものではない。

#### 【0120】

##### 6.1.1 リポーター遺伝子の調製および精製

DNAベクター、ヒトサイトメガロウイルス主要前初期エンハンサー/プロモーターに機能的に連結されたホタルルシフェラーゼリポーター遺伝子(LUC)を含むpCM



V. FOX. Luc-2 (図1) をコンピテント大腸菌XL-1ブルー細胞 (Stratagene, La Jolla, CA) に安定にトランスフェクトし、Luria Bertani (LB) 培地で培養し、さらにアルカリ溶解によって単離した。次いで、プラスミドを陰イオン交換樹脂 (Qiagen, Santa Clarita, CA) に通して内毒素が減少したスーパーコイルプラスミドを得た。精製した後、プラスミドを10mMのTris-HClおよび1mMのEDTAを含有する溶液に懸濁する。プラスミドDNA、 $\alpha$ -1アンチトリプシン遺伝子を含むpBATimg-2は同様の手順を用いて調製および精製した。ヒト成長ホルモン遺伝子を含むプラスミドpCMV.FOX.hGHは同様の手順を用いて調製および精製した。

#### 【0121】

##### 6.1.2 in vivoトランスフェクション用核酸溶液の調製

核酸/遷移金属エンハンサー混合物を、ポリスチレンチューブに脱イオン水または緩衝溶液、DNA、および所望の遷移金属エンハンサーを混合しながら逐次加えることによって調製した。「遊離」(すなわち、「裸の」) DNA対照は、水または緩衝溶液にDNAを逐次加えることによって調製した。

#### 【0122】

##### 6.1.3 麻酔の投与

ケタミン(30mg/kg)、キシラジン(6.0mg/kg)およびアセプロマジン(1.0mg/kg)を含んでなる混合物をすべての実験動物に筋内注射した。

#### 【0123】

##### 6.1.4 核酸/遷移金属エンハンサーのラット唾液腺への管内送達

雄のSprague-Dawleyラット(260-280g)を処置前の夜間絶食させた。麻酔を投与した後(6.1.3節参照)、左右双方の唾液腺管(詳しくは、ウォートン管)を細いポリウレタンチューブ(内径0.005インチ)でカニユーレ処置し、所望の位置に固定した。次いで、アトロピン(0.5mg/kg)を皮下投与し、8分後に50 $\mu$ lの核酸/遷移金属エンハンサー混合物を管口もしくはその全長のいずれかの点で管に直接に注射、注入、滴下注入または投与した。Goldfine, Nature Biotechnology 15:1378, 1997参照。

#### 【0124】

リポソーム/遷移金属/核酸混合物を用いた実施形態では、200 $\mu$ lのリポソーム

/遷移金属/核酸混合物を管口もしくはその全長のいずれかの点で管に直接に注射、注入、滴下注入または投与した。Goldfine, Nature Biotechnology 15:1378, 1997参照。リポソーム/遷移金属/核酸混合物は、ポリプロピレンチューブに適量の滅菌水、リポソーム溶液(3:1、N,N,N',N'-テトラメチル-N,N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2,3-ビス(9(z)-オクタデセノイルオキシ)-1,4-ブタンジアミニウムヨージド(DOHBDO):DOPE)、遷移金属エンハンサー、およびプラスミドDNA pCMV.FOX.hGHを逐次加えることによって調製した。

#### 【0125】

リポソーム/遷移金属/核酸混合物または核酸/遷移金属エンハンサー混合物が送達されるかに関わらず、チューブおよび混合物は混合物の適用後除去する前にさらに10分間所定の位置に維持した。アトロピン投与の48時間後、ペントバルビタール(50mg/kg)の腹膜内注射によってラットに麻酔を施した。左右の顎下腺を摘出し、以下に記載の方法を用いていずれかの観察可能なレポーター遺伝子(hGHのルシフェラーゼ)発現について組織をアッセイした。

#### 【0126】

##### 6.1.5 ルシフェラーゼアッセイ

本出願にて特許請求する発明は、遺伝子送達のために遷移金属エンハンサーと注目される核酸の組み合わせを用いる新規方法を記載している。本発明は遺伝子送達効率を向上させることにより遺伝子発現を高め得る方法を提供する。遺伝子発現におけるこの変化はルシフェラーゼアッセイなどの種々のアッセイを用いて定量できる、de Wetら, Molec. Cell Biol. 7:725, 1987。本明細書に記載される種々の実験では、pCMV.FOX.Luc-2含有溶液投与の48時間後に雄のSprague-Dawleyラットから左右の顎下腺を摘出した。さらなる実験ではラット肺などの他の器官を用いた。

#### 【0127】

顎下腺を調べた実験では、雄のSprague-Dawleyラット各々の左右の顎下腺に存在するルシフェラーゼ量を独立に測定し、個別の個々の実験(例えば、試験)として処理したが、これは一方の顎下腺によって発現されるルシフェラーゼ量は他方の顎下腺で発現されるルシフェラーゼ量と無関係であるためである。従って、

各顎下腺を独立に溶解バッファー (0.1gの組織当たり1.0mlのバッファー) に溶解して溶解ホモジネートを作製した。溶解バッファーは100mMの $K_2PO_4$  pH7.0、1mMのジチオスレイトール、および1%のTriton X-100を含んでいた。各顎下腺に由来する溶解ホモジネートの100 $\mu$ lのアリコートにMonolight 2010 照度計 (Analytical Luminescence Laboratories) を用いてルシフェラーゼ活性について分析した (de Wetら, Molec. Cell Biol. 7:725, 1987)。従って、溶解ホモジネートの各アリコートからのルシフェラーゼ光発光を10秒間にわたって測定した。

#### 【0128】

活性は相対光単位、すなわちアッセイ条件、ルシフェラーゼ濃度、照度計光電子増倍管感度およびバックグラウンドを総合的に表す値として表した。よく知られた技術を用いて、ルシフェラーゼ光単位を、例えば、ルシフェラーゼタンパク質のピコグラムに変換することもできる。例えば、実施例13のFelgnerら、特許第5,580,899号参照。すべての実験は二連で実施した。顎下腺を用いる実験では、個々の顎下腺溶解ホモジネート各々に由来するデータを単一の試験として報告する。複数の試験 (n=4) の結果を平均して、以下の表1~8に記載する。

#### 【0129】

##### 6.1.6 マウス肺におけるDNA含有生成物の気管内送達

雄のBALB/cマウス (特定の病原体を含まない、Charles River Laboratories; 20-21g) をトランスフェクション実験に用いた。すべての侵襲的処置のために麻酔を施し、標準的なプロトコールに従うペントバルビタールの腹腔内投与によって動物の処置を終えた。前側頸部の皮膚を1センチメートル切開して麻酔を施したマウスの頸部を切開した。喉頭の下に1-3気管環間に挿入した半インチの30ゲージニードルを用いて150 $\mu$ lの核酸/遷移金属エンハンサーを送達した。比較のために、滅菌水中に遊離核酸溶液 (512 $\mu$ gのDNAを含有する150 $\mu$ l) を調製して同様に送達した。注射後、切開点をステープルを用いて修復した。マウスは処置後48時間内に屠殺した。気管/肺ブロックを解剖し、次いで、0.1Mのリン酸カリウムバッファー (pH7.8)、1%のTriton X-100、1mMのジチオスレイトール、および2mMのEDTAを含んでなる冷溶解バッファー中でホモジネートし、ルシフェラーゼ活性について分析した。

## 【0130】

6.1.7 ラット膵臓または肝臓へのDNA含有生成物の膵管内滴下注入

雄のSprague-Dawleyラット（体重260-280g）を処置前の夜間絶食させた。この手順が確実に滅菌条件下で実施されるよう注意を払った。麻酔（前記参照）および開腹術後、胆管の遠心端（十二指腸のレベルで）を結紮し、膵臓の近接端部（肝門部レベルで）を結紮によって一時的に遮断し、十二指腸近くの胆管を切開してPE-10チューブを挿入した。0.1mlの選択した核酸/遷移金属エンハンサー混合物を管に逆方向に注射した。注射の成功は腺の可視での膨張によって確認した。肝臓への投与のためには、胆管の近接部分（膵臓組織へ入る前の）に注射した。DNA送達後、胆汁の流れをPE-10チューブの外部末端を介して十二指腸に直接導くことによってバイパス手術を行った。結紮が確実にあることを注意深く確認した後、1mlのアンピシリン(15mg/ml)を腹腔に注射し、筋膜と皮膚を3-0絹縫合で結合して切開を一層で閉じた。閉じた切開を希釈エタノールで洗浄し、動物を完全に覚醒し歩行できるようになるまで加熱ランプ下でモニターした。処置の48時間後にマウスの処理を終えた。膵臓および肝臓を摘出し、冷溶解バッファー中で独立にホモゲナイズし、ルシフェラーゼ活性についてアッセイした。

## 【0131】

6.1.8 ヒト $\alpha$ -1アンチトリプシンアッセイ

ポリスチレン96ウェルプレート(Costar#3590)を一次被覆抗体（1×炭酸バッファーに1:1000希釈したウサギポリクローナル;Roche#605002、使用100/ウェル）で被覆し、加湿したハイブリダイゼーショントレイにプレーティングして冷蔵庫（4°C）中で一晩インキュベートした。次いで、プレートをPBS-T（リン酸緩衝生理食塩水+0.5%のTween-20:200/ウェル）で2回洗浄し、PBS-T+1%のBSA（200 $\mu$ L/ウェル）で室温にて1時間ブロッキングした。3回のPBS-T洗浄後、試験サンプルを加え（100 $\mu$ L/ウェル）、マイクロプレートシェーカー（500rpm）上で室温にて3時間インキュベートした。5回のPBS-T洗浄後、二次抗体（PBS-T+1%のBSAに1:2000希釈したヤギポリクローナル;ICN#55236:100 $\mu$ L/ウェル）を加え、マイクロプレートシェーカー（500rpm）上で60分間インキュベートした。次いで、プレートをPBS-Tで5回洗浄し、TMB基質（Dako#S1600:100 $\mu$ L/ウェル）を加えた。アッセ

イの発色には20分を要し、プレートリーダーセットで650nm波長にてモニターした(SOFTmax. v3. 0. ソフトウェアを用いるMolecular Devices SpectraMax190)。この時点で2NのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>停止溶液(100  $\mu$ L/ウェル)を加え、450nmで最終読み取りを行った。

### 【0132】

#### 6.1.9 リポソーム溶液の調製

ある実施形態では、1.9mLのサンプルバイアルに適当量のカチオン性脂質および中性脂質ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)をクロロホルム中の溶液として加えて所望のモル比のカチオン性脂質:DOPEを得た。37°Cでの回転蒸発によってクロロホルムを除去した。得られた薄い脂質フィルムを真空下に一晚置き、すべての微量の溶媒を確実に除去した。脂質混合物をフィルムが水和するまで25°Cにて1mLの滅菌水に再懸濁し、次いで、ボルテックスで混合してエマルションを得た。in vitro実験用には、これらのエマルションを1mMのカチオン性脂質濃度として処方した。in vivo実験用には、3mMのカチオン性脂質濃度でエマルションを処方した。

### 【0133】

#### 6.1.10 細胞培養

NIH3T3細胞をATCC (CRL1658)から入手し、10%のウシ血清を含むダルベッコの改変イーグル培地で培養し、トランスフェクションの24時間前に標準的な24ウェル組織培養プレートにプレーティングした。細胞はトランスフェクションの時点で約80%コンフルエントであった。

### 【0134】

#### 6.1.11 培養細胞のトランスフェクション

NIH3T3細胞を6.1.10節に記載のように24ウェルの組織培養プレートにプレーティングした。吸引によって増殖培地を除去し、細胞を0.5mLのPBS/ウェルで1回洗浄した。リポソーム/遷移金属/核酸溶液は適当量のDMEM(血清を含まない)、リポソーム溶液(1:1 N,N-[ビス(2-ヒドロキシエチル)]-N-メチル-N-[2,3-ビス(テトラデカノイルオキシ)プロピル]アンモニウムクロリド(DMDHP):DOPE)、塩化亜鉛、およびプラスミドDNA pCMV.FOX.Luc.2.を逐次加えることによって形成し

た。用いたリポソーム溶液量は、所望のカチオン性脂質とDNAリン酸塩の比に依存した。これらの物質を加えた後、ボルテックスで十分に混合し、室温にて15分間インキュベートした。得られたトランスフェクション複合物の200マイクロリットルのアリコートを各ウェルに加え（1マイクログラムDNA/ウェル、 $n=4$ ）、細胞を37°Cにて4時間インキュベートした。この時点で、500マイクロリットルのDMEM+10%ウシ血清/ウェルを加え、溶解および分析の前に細胞を約48時間培養した。次いで、溶解および分析の前にサンプルトランスフェクションを最低3回反復した。

### 【0135】

#### 6.1.12 カチオン性脂質/遷移金属エンハンサー/核酸複合物を用いるルシフェラーゼアッセイ

本出願にて特許請求する発明は、遺伝子送達のためにカチオン性脂質、遷移金属エンハンサーおよび注目される核酸の組み合わせを用いる新規方法を記載している。本発明は遺伝子送達効率を向上させることによって遺伝子発現を高め得る方法を提供する。遺伝子発現におけるこの変化はルシフェラーゼアッセイなどの種々のアッセイを用いて定量できる、de Wetら, *Molec. Cell Biol.* 7:725, 1987。本明細書に記載されるカチオン性脂質/遷移金属エンハンサー/核酸複合物を用いたin vitro実験では、細胞を、pCMV.FOX.Luc-2含有溶液投与の48時間後に溶解バッファーを用いて溶解した。溶解バッファーは100mMの $K_2PO_4$  pH7.0、1mMのジチオスレイトール、および1%のTriton X-100を含んでいた。溶解物の25 $\mu$ lのアリコートをMonolight2010照度計 (Analytical Luminescence Laboratories) を用いてルシフェラーゼ活性について分析した(de Wetら, *Molec. Cell Biol.* 7:725, 1987)。従って、溶解ホモジネートの各アリコートからのルシフェラーゼ光発光を10秒間にわたって測定した。活性は相対光単位、すなわちアッセイ条件、ルシフェラーゼ濃度、照度計光電子増倍管感度およびバックグラウンドを総合的に表す値として表した。よく知られた技術を用いて、ルシフェラーゼ光単位を、例えば、ルシフェラーゼタンパク質のピコグラムに変換することもできる。例えば、実施例13のFelgnerら、米国特許第5,580,899号参照。複数の試験 ( $n=4$ ) の結果をを平均し、表10に記載する。

## 【0136】

## 6.2 実験の実施例

下記の実施例は本発明の方法を説明するために提供するものである。

## 【0137】

6.2.1 実施例1 塩化亜鉛介在型トランスフェクションにおよぼすDNA投与量の影響

in vivoでの塩化亜鉛介在型トランスフェクションに最適なDNA投与量を決定するために実験を行った。この試験を行うために、DNA/亜鉛混合物A-1～A-4は、ポリスチレン製の試験管内で適当な量の水、塩化亜鉛、およびpCMV. FOX. Luc. 2プラスミドDNAを混合することによって調製した。塩化亜鉛のDNAに対する相対量は1mgのDNAに対して0.19mgの塩化亜鉛の比率に維持した。比較のために、DNA対照溶液B-1～B-4は、塩化亜鉛を添加しないこと以外は同様に調製した。DNA/亜鉛混合物および対照溶液の双方を、上述のラットの唾液腺モデルを用いてDNAの投与量を32、64、96、128  $\mu$ gとして、in vivoトランスフェクション活性についてスクリーニングした。具体的には、特定のDNA/亜鉛混合物もしくはDNA対照溶液の50  $\mu$ Lを、4匹の雄のSprague-Dawleyラットの左右の顎下腺の双方に投与した。投与の48時間後に、その双方の腺を取り、ルシフェラーゼの比活性を上述のとおりアッセイした。本実験で調べた各処置条件から得られた結果の平均を表1に示している。ラットの唾液腺でのトランスフェクション活性は、遊離DNAの溶液と比較してDNA/亜鉛混合物は高い活性を示すことをこのデータは示している。さらに、このデータはいくつかのDNA投与量と亜鉛の濃度を用いればトランスフェクション活性が改善されることを示している。

## 【0138】

【表1】

塩化亜鉛介在型トランスフェクションにおよぼすDNA投与量の影響

溶液	DNA投与量( $\mu$ g)	塩化亜鉛	バッファー(mM)	相対光単位
A-1	32	0.9	1.6	57884
A-2	64	1.8	3.2	145179
A-3	96	2.7	4.8	192936

A-4	128	3.6	6.4	756838
B-1	32	0	1.6	24322
B-2	64	0	3.2	31885
B-3	96	0	4.8	59774
B-4	128	0	6.4	36195

## 【0139】

## 6.2.2 実施例2. ニッケル介在型in vivoトランスフェクション

ニッケルがin vivoでのトランスフェクションを促進するか否かを調べるために実験を行った。この試験を行うために、ポリスチレン製の試験管内で適量の水、塩化ニッケル、およびpCMV.FOX.Luc.2プラスミドDNAを混合しながら順次添加することによってDNA/ニッケル混合物を調製した。塩化ニッケルの濃度を0.3mMおよび0.9mMとした混合物を調製し、その混合物の50 $\mu$ L (32 $\mu$ gのDNAを含有)を雄のSprague-Dawleyラットの左右の顎下腺に投与してin vivoトランスフェクション活性についてスクリーニングした。比較のために、50 $\mu$ LのDNA/亜鉛混合物(0.9mM 塩化亜鉛、および32 $\mu$ g DNA)もラットの顎下腺に投与した。投与の48時間後に顎下腺を取り、ルシフェラーゼ比活性を上述のとおりアッセイした。8個の別々の腺から得られた結果の平均を表2に示している。この試験の結果は、ニッケルがin vivoでのトランスフェクションを投与量依存的に促進することを示している。さらに、ニッケルのトランスフェクション促進能は、亜鉛を用いることによって観察されたものと類似のものであった。

## 【0140】

【表2】

塩化ニッケル介在型と塩化亜鉛介在型のin vivo トランスフェクションの比較

金属塩化物 <sup>†</sup>	濃度(mM) <sup>‡</sup>	平均 <sup>§</sup>
Ni	0.3	18391
Ni	0.9	65121
Zn	0.9	63842

<sup>†</sup> 核酸/遷移金属エンハンサー溶液中に存在する金属塩化物

<sup>‡</sup> 核酸/遷移金属エンハンサー溶液中で用いられた金属塩化物の濃度



§ 8個のラット顎下腺から得られた平均相対光単位

【0141】

### 6.2.3 実施例3 銅介在型in vivoトランスフェクション

銅がin vivoでのトランスフェクションを促進するか否かを調べるために実験を行った。この試験を行うために、ポリスチレン製の試験管内に適量の水、Tris-HCl、EDTA、塩化銅、およびDNA(pCMV, FOX, Luc. 2)を順次添加することによってDNA/銅混合物を調製した。塩化銅の濃度を0.3mM、0.9mM、および1.2mMとした混合物を調製し、その混合物の50  $\mu$ L (32  $\mu$ gのDNAを含有)を、4匹の雄のSprague-Dawleyラットの左右の顎下腺に投与してin vivoトランスフェクション活性についてスクリーニングした。比較のために、50  $\mu$ LのDNA/亜鉛混合物(0.9mM 塩化亜鉛、および32  $\mu$ g DNA)も4匹のラットの顎下腺に投与した。投与の48時間後に顎下腺を取り、ルシフェラーゼ比活性を上述のとおりアッセイした。本研究で試験した各処置条件から得られた結果の平均を表3に示している。この試験の結果は、銅もin vivoでのトランスフェクションを促進するために用いることを示している。さらに、銅のトランスフェクション促進能は亜鉛を用いることによって観察されたものよりすぐれたものであった。

【0142】

【表3】

塩化銅介在型と塩化亜鉛介在型のin vivo トランスフェクションの比較

金属塩化物 <sup>†</sup>	濃度 (mM) <sup>‡</sup>	平均 §
Cu	0.6	17667
Cu	0.9	42204
Cu	1.2	17194
Zn	0.9	5685

<sup>†</sup> 核酸/遷移金属エンハンサー溶液中に存在する金属塩化物

<sup>‡</sup> 核酸/遷移金属エンハンサー溶液中で用いられた金属塩化物の濃度

§ 8個のラット顎下腺から得られた平均相対光単位

【0143】

### 6.2.4 実施例4 コバルト介在型in vivoトランスフェクション

コバルトがin vivoでのトランスフェクションを促進するか否かを調べるために実験を行った。この試験を行うために、ポリスチレン製の試験管内に適当な量の水、塩化コバルト、およびDNA (pCMV, FOX, Luc. 2) を順次添加することによってDNA/コバルト混合物を調製した。塩化コバルトの濃度を0.3mM、および0.9mMとした混合物を調製し、その混合物の50  $\mu$ L (32  $\mu$ gのDNAを含有) を、4匹の雄のSprague-Dawleyラットの左右の顎下腺に投与してin vivoトランスフェクション活性についてスクリーニングした。比較のために、50  $\mu$ Lの「遊離」DNAの溶液 (32  $\mu$ g DNA) も4匹のラットの顎下腺に投与した。投与の48時間後に顎下腺を取り、ルシフェラーゼ比活性を上述のとおりアッセイした。本研究で調べた各処置条件から得られた結果の平均を表4に示している。この試験の結果は、「遊離」DNAの溶液と比較するとコバルトがin vivoでのトランスフェクションを促進することを示している。さらに、ここで観察されたコバルトのトランスフェクション促進能は、スクリーニングした2種類のコバルト濃度の双方で観察された。

【0144】

【表4】

塩化コバルトのin vivo トランスフェクションにおよぼす影響<sup>§</sup>

塩化コバルト濃度 (mM)	平均
—	23698
0.3	37219
0.9	44926

§ 各試験でのデータは、ルシフェラーゼアッセイの間に産生された相対光単位を示している。

【0145】

#### 6.2.5 実施例5 マウス肺における遷移金属介在型トランスフェクション

遷移金属がマウス肺におけるin vivoでのトランスフェクションを促進するか否かを調べるために実験を行った。この試験を行うために、ポリスチレン製の試験管内に適当な量の水、塩化亜鉛、およびDNA (pCMV, FOX, Luc. 2) を順次添加することによってDNA/亜鉛混合物を調製した。この混合物の塩化亜鉛の最終濃度は3.6mMであった。その混合物の150  $\mu$ L (384  $\mu$ gのDNAを含有) を、4匹の雄のBALB/cマ

ウスの肺に気管内投与することによってin vivoトランスフェクション活性についてスクリーニングした。比較のために、150  $\mu$ LのDNA溶液(354  $\mu$ g DNA)も4匹のマウスの肺に気管内投与した。投与の48時間後に気管/肺のブロックを摘出し、ルシフェラーゼ比活性を上述のとおりアッセイした。本研究で調べた各処置条件から得られた結果の平均を表5に示している。この試験の結果は、遷移金属がマウス肺におけるin vivoでのトランスフェクションを促進するために用いることを示している。この場合では、塩化亜鉛はトランスフェクション活性を「遊離」DNAを含む溶液と比較して5倍増加させた。

【0146】

【表5】

マウス肺におけるトランスフェクションにおよぼす塩化亜鉛の影響<sup>§</sup>

処置条件	平均
「遊離」DNA	535.2
DNA+塩化亜鉛	2715.8

§ 各試験のデータは、ルシフェラーゼアッセイの際に産生された相対光単位を示している。

【0147】

#### 6.2.6 実施例6 遷移金属介在型トランスフェクションにおよぼす金属リガンド置換の影響

遷移金属の塩化物以外の遷移金属化合物がin vivoでのトランスフェクションの促進能を有するか否かを調べるために実験を行った。この試験では、塩化亜鉛のラット唾液腺でのトランスフェクション促進能を硫酸亜鉛および酢酸亜鉛と比較した。各亜鉛含有化合物について、ポリスチレン製の試験管内に適当な量の水、亜鉛含有化合物(塩化亜鉛、酢酸亜鉛、もしくは硫酸亜鉛のいずれか)、およびDNA(pCMV, FOX, Luc, 2)を順次添加することによってDNA/亜鉛混合物を調製した。各混合物における亜鉛の最終濃度は3.6mMであった。各亜鉛化合物の相対的トランスフェクション活性は、DNA/亜鉛混合物の50  $\mu$ L(128  $\mu$ gのDNAを含有)を雄のSprague-Dawleyラットの左右の顎下腺に投与して測定した。投与の48時間後に顎下腺を取り、ルシフェラーゼ比活性を上述のとおりアッセイした。本研究で調べた

各処置条件から得られた結果の平均を表6に示している。本研究の結果は、硫酸亜鉛および酢酸亜鉛は、塩化亜鉛よりもin vivoでのトランスフェクションを強く促進することを示している。本研究はまた、有機リガンド(酢酸)もしくは無機リガンド(硫酸および塩酸)のいずれかを含有する遷移金属化合物がin vivoトランスフェクションを促進することができることを示している。

【0148】

【表6】

ラット唾液腺で観察されたトランスフェクション活性におよぼす亜鉛リガンド構造物の影響<sup>§</sup>

遷移金属エンハンサー	平均
酢酸亜鉛 $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$	309965
塩化亜鉛 $\text{ZnCl}_2$	243362
硫酸亜鉛 $\text{ZnSO}_4$	355676

§ 各試験のデータは、ルシフェラーゼアッセイの際に産生された相対光単位を示す。

【0149】

#### 6.2.7 実施例7 遷移金属介在型トランスフェクションに及ぼすpHの影響

遷移金属介在型in vivoトランスフェクションに及ぼすpHの影響を調べるために実験を行った。3.6mMの塩化亜鉛を含有するDNA/亜鉛混合物をpH 5.5、6.5、7.5、および8.5に調製した。これらのDNA/亜鉛混合物の相対的トランスフェクション活性は、各DNA/亜鉛混合物の50  $\mu\text{L}$  (128  $\mu\text{g}$ のDNAを含有)を雄のSprague-Dawleyラットの左右の顎下腺に投与して測定した。比較のために、遊離DNAの溶液(50  $\mu\text{L}$ , 128  $\mu\text{g}$ , pH7.5)も4匹のラットに注射した。投与の48時間後に顎下腺を取り、ルシフェラーゼ比活性を上述のとおりアッセイした。本研究で調べた各処置条件で得られた結果(n=4)の平均を表7に示している。これらの結果は、ここでスクリーニングした溶液について、亜鉛/DNA溶液のpHのトランスフェクション活性に及ぼす影響は無視しうる程度のものであることを示している。

【0150】

【表7】

ラット唾液腺の塩化亜鉛介在型トランスフェクションにおよぼすpHの影響 §

塩化亜鉛 (mM)	pH	平均
3.6	5.5	252446
3.6	6.5	196002
—	7.5	52397
3.6	7.5	260340
3.6	8.5	277958

§ 各試験のデータは、ルシフェラーゼアッセイの際に産生された相対光単位を示す。

【0151】

6.2.8 実施例8 遷移金属介在型トランスフェクションに及ぼす媒質組成の影響

Tris-HClとEDTAが、活性な核酸/遷移金属エンハンサー混合物に必須の構成成分であるか否かを決定するために実験を行った。Tris-HClとEDTAはDNA溶液の保存剤として一般的に用いられている。Tris-HClとEDTAはまとめてTEと呼ぶこととするが、このTEはDNase活性を阻害し、それによってDNA溶液の酵素的分解を防ぐ。EDTAはカルシウムイオンおよびマグネシウムイオンと結合するが、それらのイオンはDNase活性に必要なものである。EDTAはまた、亜鉛およびその他の遷移金属に対して親和性を有することが知られている。上述の実験では全て、Tris-HClとEDTAを含有する核酸/遷移金属エンハンサー混合物を用いたので、これらの添加物の影響を調べた。核酸/遷移金属エンハンサー混合物の供試セットであるC-1～C-4は、その中に含まれるEDTAとTris-HClの濃度をそれぞれ変えて調製した(各溶液の組成については表8を参照せよ)。さらに、溶液C-1～C-4に対応する対照混合物のセットであるD-1～D-4を調製した(各溶液の組成については表8を参照せよ)。混合物の対照のセットであるD-1～D-4は、対照のセット中には塩化亜鉛が含まれていないことを除いては供試混合物であるC-1～C-4と同一のものとした。これらの混合物を、ラットの唾液腺モデルを用いてトランスフェクション活性についてスクリーニングした。投与の48時間後に腺を取り、上述のとおりルシフェラーゼ比活性をアッセイした。本研究で調べた各処置条件で得られた結果(n=4)の平均を表8に示している。本研究の結果は、Tris-HClとEDTAが、活性を有するDNA

/亜鉛トランスフェクション混合物にとって重要な成分ではないことを示している。しかし、Tris-HClとEDTAを含有しているDNA/亜鉛混合物は遊離DNAの溶液よりも活性が高い(表1)。この実験から得られた結果は、「活性のある」DNA/亜鉛混合物を多くの異なる処方条件を用いて調製できることを示している。

# 【0152】

【表8】

塩化亜鉛媒介型トランスフェクションに及ぼすトランスフェクション溶液組成の影響 §

溶液	塩化亜鉛 (mM)	Tris-HCl (mM)	EDTA (mM)	相対光単位
C-1	3.6	10	1	437597
C-2	3.6	10	0	139291
C-3	3.6	0	1	414083
C-4	3.6	0	0	1354218
D-1	0	10	1	26145
D-2	0	10	0	30790
D-3	0	0	1	38999
D-4	0	0	0	42413

§ 各試験のデータは、ルシフェラーゼアッセイの際に産生された相対光単位を示す。

# 【0153】

## 6.2.9 実施例9 $\alpha$ -1アンチトリプシンを用いたラット唾液腺の亜鉛介在型トランスフェクション

ラット唾液腺細胞へ $\alpha$ -1アンチトリプシン遺伝子を導入するために、遷移金属介在型トランスフェクションを用いるか否かを調べるために実験を行った。 $\alpha$ -1アンチトリプシンは血液中被分泌タンパク質である。この研究を行うために、 $\alpha$ -1アンチトリプシン遺伝子を含有するプラスミドDNAを、ルシフェラーゼプラスミドを調製するために用いた方法と類似の方法を用いて調製した。ポリスチレン製の試験管内に適量の水、塩化亜鉛、およびDNA (pBAT-iMG-2) を順次添加することによってDNA/亜鉛混合物を調製した。次に、この混合物のアリ

コート (50  $\mu$ L, 128mgのDNAを含有) を4匹のラットの左右の顎下腺の双方に注射した。比較のために、50mLの遊離DNAの溶液 (128mg DNA) も4匹のラットの顎下腺に投与した。投与の48時間後に顎下腺を取り、溶解バッファー (100mM  $K_2PO_4$ , pH7.0, 1mM ジチオトレイトール、および1% Triton X-100) 中でホモジナイズし、続いて、上述の方法で $\alpha$ -1アンチトリプシンの有無についてアッセイした。表9に示した結果は、DNA/亜鉛混合物の投与が、遊離DNAの溶液の投与よりも高レベルの $\alpha$ -1アンチトリプシンの発現をもたらしたことを示している。

【0154】

【表9】

ラット唾液腺で観察された $\alpha$ -1アンチトリプシンの発現に及ぼす塩化亜鉛の影響

塩化亜鉛	$\alpha$ -1アンチトリプシンの発現 (mg/mL)
—	19.4
3.6	31.6

【0155】

#### 6.2.10 実施例10 ラット脾臓で観察されたルシフェラーゼの発現に及ぼす塩化亜鉛の影響

第6.1.7節に記載のラット脾臓モデルを用いて、ルシフェラーゼの発現に及ぼす塩化亜鉛の影響を調べるために実験を行った。ルシフェラーゼアッセイを上述のとおり用いて、(i)塩化亜鉛の存在しない状態、および(ii)塩化亜鉛の存在している状態でのpCMV.FOX.Luc-2の相対的な有効性を独立した試験で各々を調べた。各試験で、総液量100  $\mu$ L中に64  $\mu$ gのpCMV.FOX.Luc-2を含む液を、第6.1.7節に記載のとおり、十二指腸近傍の胆管中に注射した。塩化亜鉛の存在下で行った試験では、注射した溶液中の塩化亜鉛の濃度は1.8mMであった。ルシフェラーゼ活性は処置の48時間後にアッセイした。塩化亜鉛の不在下で行った4回の試験でのルシフェラーゼ活性の平均は、10mgの脾臓組織あたりの相対光単位が7274であった。これに対して、塩化亜鉛の存在下で行った4回の試験でのルシフェラーゼ活性の平均は10mgの脾臓組織あたりの相対光単位が22028であった。これらの実験は、塩化亜鉛が存在するとラット脾臓でのルシフェラーゼの発現を顕著に増強することを示している。

## 【0156】

6.2.11 実施例11 NIH 3T3細胞へのカチオン性リポソーム介在型遺伝子送達に及ぼす亜鉛添加の影響

カチオン性脂質/核酸複合体のin vitroトランスフェクション活性を増強するために塩化亜鉛を用いることを示す実験を行った。この研究を行うために、ポリスチレン製の試験管中で適当な量の無血清DMEM、カチオン性リポソーム、塩化亜鉛、およびpCMV.FOX.Luc-2プラスミドDNAを混合することによってカチオン性脂質/核酸/亜鉛複合体を調製した。この実験では、カチオン性脂質/核酸複合体は種々のカチオン性脂質：核酸のリン酸の電荷比で形成する。具体的に述べれば、複合体は電荷比が0.5、0.75、1.0、および2.0で形成した。電荷比が1.0より高い値で形成した複合体はネットで正の電荷を有し、これに対して1.0より低い値で形成した複合体はネットで負の電荷を有する。カチオン性脂質/核酸のリン酸の電荷比は、カチオン性脂質/核酸複合体のトランスフェクション活性に影響を及ぼす重要な実験パラメーターである。多くの場合、ネットで正の電荷を有する複合体はネットで中性もしくはネットで負の電荷のものよりも活性が強い。各電荷比のカチオン性脂質/核酸複合体を、種々の濃度(0.0、0.1、1、10、100、および1000  $\mu$ M)の塩化亜鉛の存在下で、NIH 3T3細胞でのトランスフェクション活性についてスクリーニングした。NIH 3T3細胞はマウス線維芽組織培養細胞系統で、遺伝子送達試薬のin vitroでのトランスフェクション活性を示すために一般的に用いられている。カチオン性脂質/DNA/亜鉛溶液を細胞に適用してから48時間後に、細胞を溶解バッファーで溶解し、溶解物をルシフェラーゼ比活性についてアッセイした。図3および表10に示すとおり、データは、亜鉛がカチオン性リポソーム/DNA混合物中に添加されると、培養NIH 3T3マウス線維芽細胞のin vitroトランスフェクションを、カチオン性脂質対核酸の電荷比に応じて2倍から40倍増強することができることを明確に示している。この効果は、より低い電荷比ではいっそう顕著ではあるが、スクリーニングした全ての電荷比で観察された。本発明の方法が電荷比の低いカチオン性脂質/DNA複合体の活性を増強させることは、高度に荷電した複合体は著しい細胞傷害性を有するので、従来のシステムに勝る大きな利点である。



【0157】

【表10】

NIH 3T3 細胞へのカチオン性リポソーム介在型 遺伝子送達に及ぼす  
亜鉛添加の影響

脂質 / DNA 電荷比	亜鉛濃度 (μM)					
	0	0.1	1	10	100	1000
0.5	34366.5	357320	289649.8	296498.3	690512.3	44053.75
0.75	113887	528118.8	141950	397689.3	334007.5	298625.5
1	869865	931446.8	835699.8	1366067	359188.5	414392
2	767710	677663.5	747069.5	1215879	827479.8	109543.8

0.5 電荷比						
	ZnCl <sub>2</sub> (μM)	試験 1	試験 2	試験 3	試験 4	平均
	0	3146	61387	21468	51465	34366.5
	0.1	487868	426369	256897	258146	357320
	1	385049	200471	304108	268971	289649.8
	10	325001	323001	250110	287881	296498.3
	100	351939	252969	294018	1863123	690512.3
	1000	43835	40236	59395	32749	44053.75
0.75 電荷比						
	ZnCl <sub>2</sub> (μM)	試験 1	試験 2	試験 3	試験 4	平均
	0	118667	128866	103034	104981	113887
	0.1	613179	556656	437658	504982	528118.8
	1	127339	236302	123913	80246	141950
	10	455299	465986	362168	307304	397689.3
	100	404983	351094	358591	221362	334007.5
	1000	335343	257292	374511	227356	298625.5
1 電荷比						
	ZnCl <sub>2</sub> (μM)	試験 1	試験 2	試験 3	試験 4	平均
	0	617205	876229	1077503	908523	869865
	0.1	901184	862221	1113520	848862	931446.8
	1	942667	864670	799992	735470	835699.8
	10	2145687	1433861	1202748	681970	1366067
	100	262768	379927	447492	346567	359188.5
	1000	437998	443459	502263	273848	414392
2 電荷比						
	ZnCl <sub>2</sub> (μM)	試験 1	試験 2	試験 3	試験 4	平均

	ZnCl <sub>2</sub> (μM)	試験 1	試験 2	試験 3	試験 4	平均
	0	1017767	777548	684552	590973	767710
	0.1	596911	685311	818392	610040	677663.5
	1	661803	814409	754168	757898	747069.5
	10	1498720	1238992	1207690	918114	1215879
	100	768327	880621	941720	719251	827479.8
	1000	199493	48657	189902	123	109543.8

## 【0158】

## 6.2.12 実施例12 ラット顎下腺へのカチオン性リポソーム介在型遺伝子送達に及ぼす亜鉛添加の影響

カチオン性脂質/核酸複合体のin vivoトランスフェクション活性を増強するために塩化亜鉛を用いることを示す実験を行った。この研究を行うために、ポリスチレン製の試験管中で適当な量の滅菌水、カチオン性リポソーム、塩化亜鉛、およびpCMV, FOX, hGHプラスミドDNAを混合することによってカチオン性脂質/核酸/亜鉛複合体を調製した。具体的には、40 μLの3mM 3:1 DOHBD:DOPEリポソーム混合物、270 μLの8.08 μg/μLのpCMV, FOX, hGHプラスミドDNA混合物、および適当な量の70mM 塩化亜鉛混合物を、十分量の水を含有するポリスチレン試験管に添加して最終の総液量を2500 μLとした。この実験で塩化亜鉛の最終濃度は0.125mM、0.250mM、もしくは亜鉛を全く含まない、のいずれかとした。本研究でのカチオン性脂質 : DNAリン酸比はスクリーニングする混合物全てについて一定に維持した。調製後、各混合物の200 μLを4匹の雄のSprague-Dawleyラットの左右の顎下腺中に注入した。このように、175 μgのプラスミドDNAを顎下腺の各々に注入した。カチオン性脂質/核酸/亜鉛複合体投与の1週間後、ラットの唾液腺を摘出し、リン酸溶解バッファー(10mM, pH8.0)と混合し、ホモジナイズした。続いて、そのホモジネートをヒト成長ホルモンタンパク質の発現についてアッセイした。データ(表11)は、亜鉛がカチオン性リポソーム/核酸混合物中に添加されると、ラット顎下腺でのin vivoトランスフェクションを、亜鉛を含まないカチオン性脂質/核酸混合物と比較すると、少なくとも2倍増強することを示している。

## 【0159】

## 【表11】

ラット顎下腺へのカチオン性リポソーム介在型遺伝子送達に及ぼす亜鉛添加の影響

亜鉛 (mM)	試験1	試験2	試験3	試験4	試験5	試験6	試験7	試験8
0	292.9	287.9	285.2	255.2	128.6	86.4	335.6	277.5
0.125	452.1	360.8	261.7	355.7	517.2	575.6	943.5	1084
0.25	857.731	753.3	272.6	315.3	604.3	449.9		

亜鉛 (mM)	平均	標準偏差
0	216.5889	87.67482
0.125	505.6361	294.0226
0.25	464.7687	236.9247

【0160】

引用した参考文献は、その各々の公表物もしくは特許もしくは特許出願が全ての目的でその全体が参照により組み入れることを特別に及び個別に指示されているのと同程度に、それらの全てについてその全体を本明細書に参照により組み入れることとする。当業者であれば明白なものであろうが、本発明の精神と範囲から乖離することなく、本発明の多数の改変と変更を行うことができる。例えば、本発明が、本明細書中に述べた特定の方法論、プロトコル、細胞タイプ、組織、ベクター、および試薬、それらはもちろん変更することのできるものであるもので、それらに限定されるものでないことは理解されるべきである。また、本明細書で用いている用語は特定の実施形態を述べる目的を持ったものであり、本発明の範囲を限定することを意図したものでないことも理解されるべきである。本明細書に記載した具体的な実施形態は例示としてのみ示したものであり、本発明は特許請求の範囲の用語、ならびにそれらの特許請求の範囲によって権利が与えられる同等物の全範囲によってのみ限定されるべきものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】

ルシフェラーゼ遺伝子をコードする組換えプラスミドpCMV.FOX.Luc-2の模式図である。

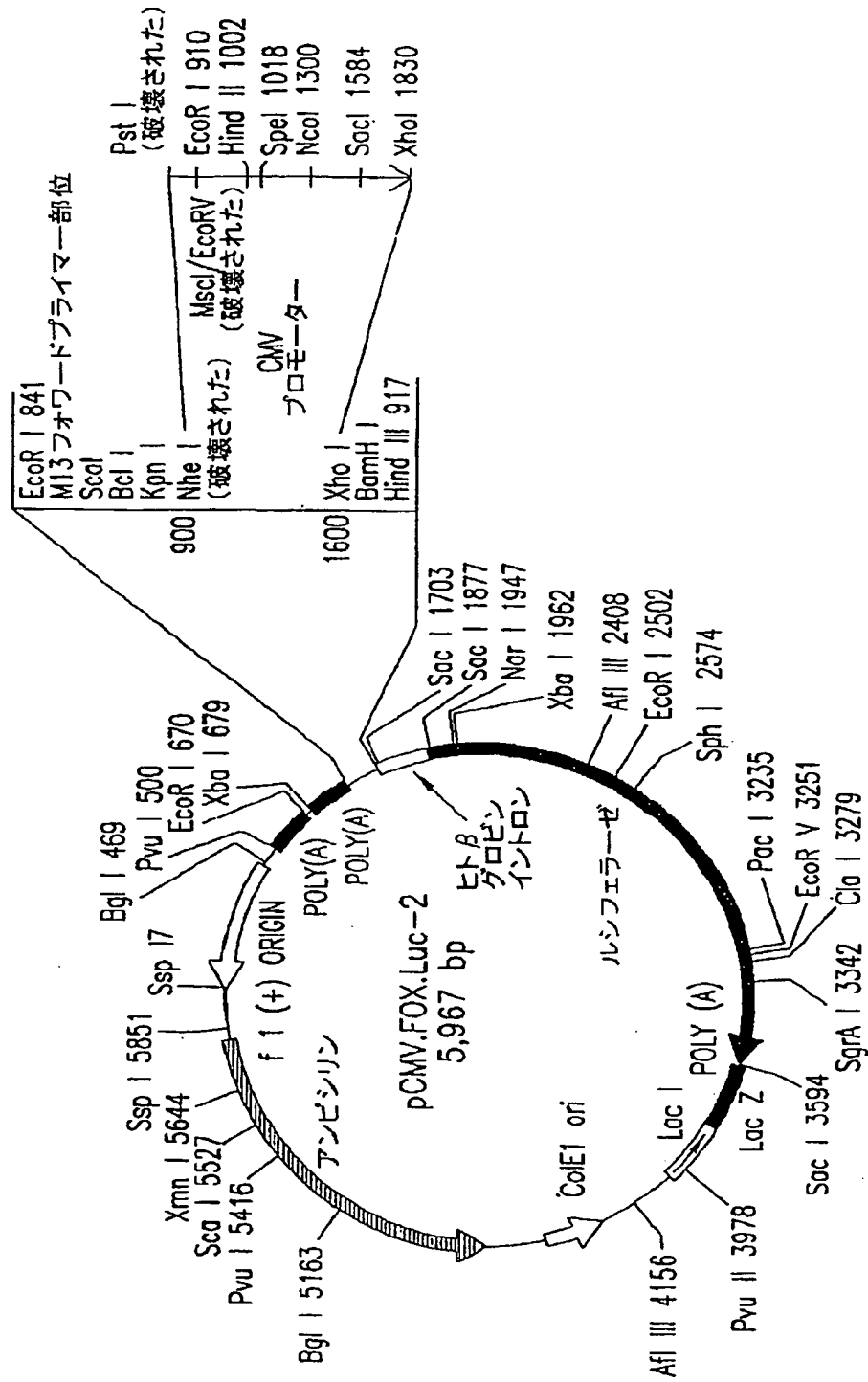
【図2】

ヒト $\alpha$ -1アンチトリプシン遺伝子をコードする組換えプラスミドpBAT-iMG-2の  
模式図である。

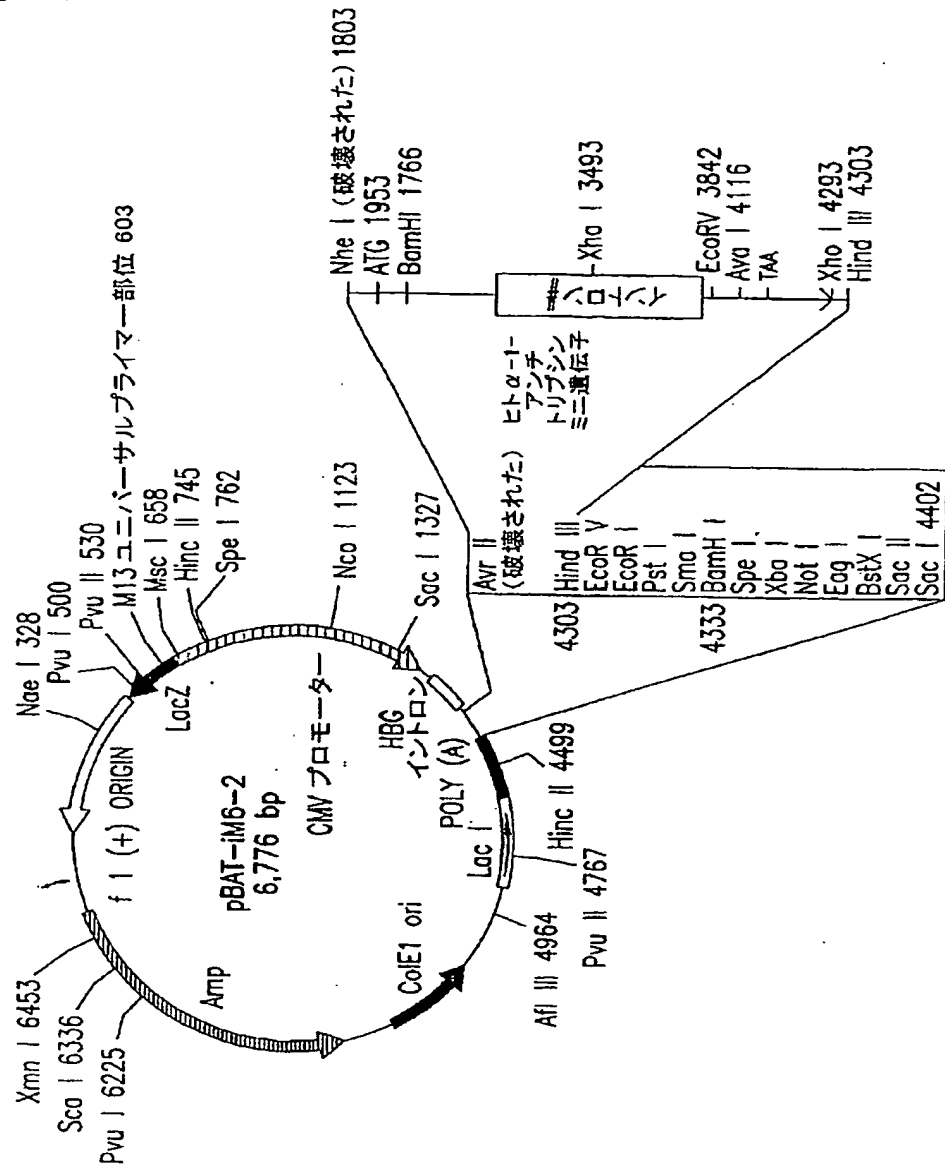
【図3】

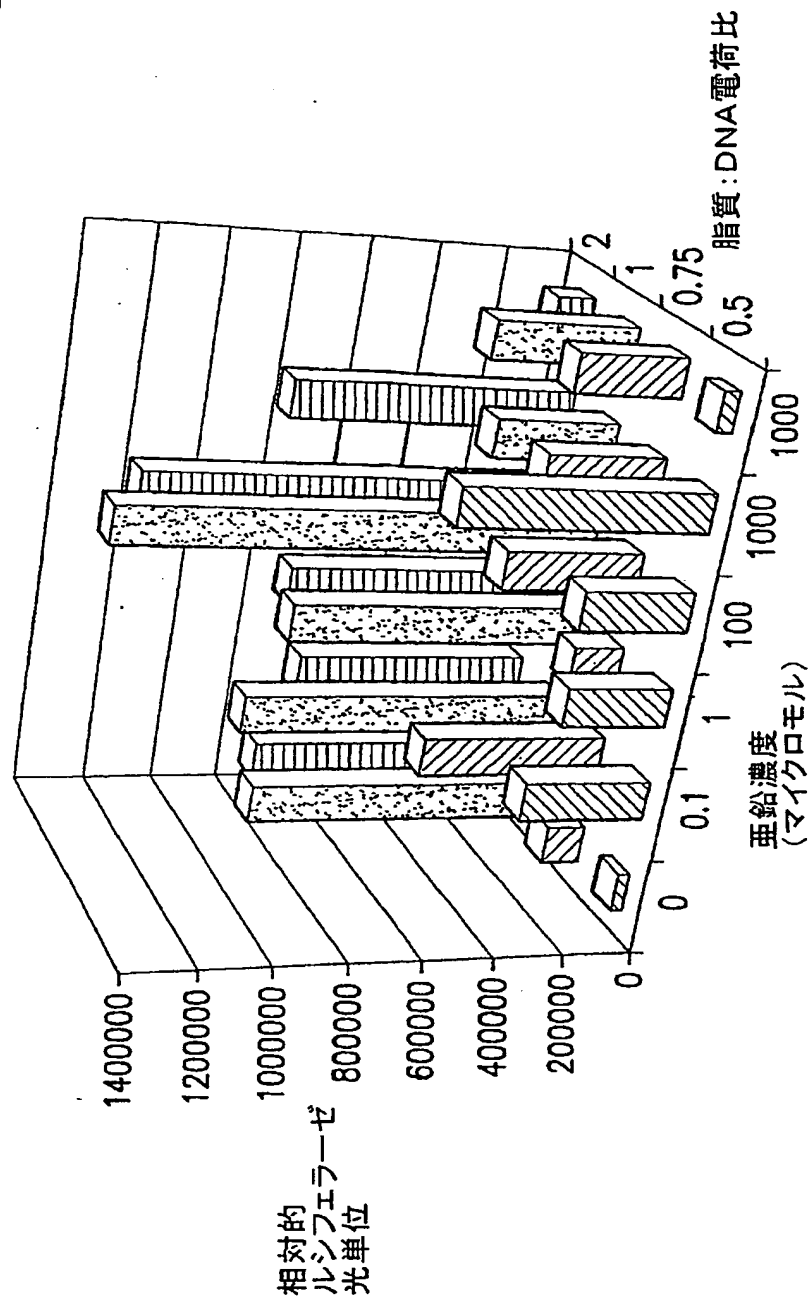
種々の電荷比のカチオン性脂質/pCMV.FOX.Luc.2複合体を、種々の濃度の $\text{ZnCl}_2$   
の存在下で、NIH 3T3細胞のトランスフェクション活性に関してスクリーニング  
した実験の結果を示した図である。

【図 1】



【図2】





## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US01/01808

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : A61K 48/00; C12N 15/00, 15/88, 15/63 US CL : 514/44; 435/320.1, 455, 458 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/44; 435/320.1, 455, 458 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched NONE Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAS ONLINE, MEDLINE																				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>																				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
A	ANDERSON. Human Gene Therapy. Nature. 30 April 1998, Vol. 392, Supp., pages 25-30, particularly page 25.	1-44																		
A	VERMA ET AL. Gene therapy - promises, problems and prospects. Nature. 18 September 1997, Vol. 389, pages 239-242, especially page 239.	1-44																		
A	FILION ET AL. Major limitations in the use of cationic liposomes for DNA delivery. International journal of pharmaceuticals. 1998, Vol. 162, pages 159-170, especially page 169, column 1.	1-44																		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																				
<table border="0"> <tr> <td>* Special categories of cited documents:</td> <td>* Y</td> <td>later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>* A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>* X</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>* B earlier document published on or after the international filing date</td> <td>* Y</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>* L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>* A</td> <td>document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>* O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>* P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:	* Y	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	* A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	* X	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	* B earlier document published on or after the international filing date	* Y	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	* L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	* A	document member of the same patent family	* O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means			* P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
* Special categories of cited documents:	* Y	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																		
* A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	* X	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																		
* B earlier document published on or after the international filing date	* Y	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																		
* L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	* A	document member of the same patent family																		
* O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means																				
* P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																				
Date of the actual completion of the international search 13 APRIL 2001		Date of mailing of the international search report 16 MAY 2001																		
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer DAVE NGUYEN Telephone No. (703) 305-3230 TERRY J. DEY PARALEGAL SPECIALIST TECHNOLOGY CENTER 1600																		



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US01/01803

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MASTRANGELO et al. Gene therapy for Human Cancer: An Essay for Clinicians. Seminars in Oncology. February 1996, Vol. 23, No.1, pages 4-21.	1-44

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	ターコード (参考)
A 6 1 P 3/10		A 6 1 P 3/10	
5/48		5/48	
9/00		9/00	
21/00		21/00	
25/00		25/00	
43/00	1 0 5	43/00	1 0 5
	1 2 1		1 2 1
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A

(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 ナンツ, マイケル, エイチ.  
 アメリカ合衆国 95616 カリフォルニア  
 州, デイヴィス, オリオール アベニュー  
 706

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA02 DA02 EA04  
 GA11 HA17  
 4C076 AA11 BB12 BB15 BB21 BB29  
 BB30 CC01 CC11 CC26 DD22  
 FF34 FF70  
 4C084 AA13 MA05 NA05 NA13 ZA01  
 ZA36 ZA66 ZA94 ZB21 ZC35  
 ZC75  
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA05 MA16  
 MA52 MA56 MA57 MA59 MA60  
 MA66 NA05 NA13 NA14 NA20  
 ZA01 ZA31 ZA36 ZA66 ZA94  
 ZB21 ZB26 ZC35